

Laboratory

Animals

Punción en la vena safena para la obtención de muestras sanguíneas del ratón, la rata, el hámster, el gerbillo, la cobaya, el hurón y el visón

Edición en Español de:
Laboratory Animals (1998) **32**, 364-368

Editado por:



Publicación patrocinada por:



**Traducción del siguiente artículo original publicado
en Laboratory Animals:**

***Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil,
guineapig, ferret and mink*** Annelise Hem, Adrian J. Smith & Per Solberg

Laboratory Animals (1998) 32, 364-368

Este artículo ha sido revisado por

Dr. José M.^a Garrido Gutiérrez. Universidad San Pablo C.E.U. Madrid

Traducción: Águeda M.^a Orellana Solares

Coordinación: Dr. Antonio Martínez Escandell. GSK. Madrid

Dr. José M.^a Orellana Muriana. Universidad de Alcalá. Madrid

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

Punción en la vena safena para la obtención de muestras sanguíneas del ratón, la rata, el hámster, el gerbillo, la cobaya, el hurón y el visón

Annelise Hem¹, Adrian J. Smith² y Per Solberg¹

¹Laboratory Animal Unit, National Institute of Public Health, PO Box 4404 Torshov, N-0403 Oslo y

²Laboratory Animal Unit, Norwegian School of Veterinary Science, PO Box 8146 Dep., N-0033 Oslo, Norway.

Resumen

En este artículo se describe un método para la obtención de muestras sanguíneas desde la vena safena lateral. Esto hace posible una rápida toma de muestras, la cual, si es necesario, puede ser repetida desde el mismo lugar sin que haya necesidad de una nueva punción. Este método es una alternativa práctica y humanitaria a la punción cardiaca y retro-orbital, en especies animales donde la punción venosa ha sido tradicionalmente considerada como problemática.

Palabras clave: Vena safena, muestra de sangre, ratón, rata, hámster, gerbillo, cobaya, roedores, hurón, visón.

Dado que la obtención de sangre es uno de los procedimientos más habituales utilizados en los animales de laboratorio, todavía es necesario refinar desde el punto de vista del bienestar animal, las técnicas disponibles (Russell & Burch 1959), ya que el estrés producido por las técnicas de obtención de muestras sanguíneas, puede afectar profundamente a las variables fisiológicas. (O'Neill & Kauffman 1990, Sarlis 1991).

Los métodos para la obtención de muestras sanguíneas en los mamíferos de laboratorio y en los pájaros, han sido revisados por el grupo formado por el BVA/FRAME/ RSPCA/UFAW y el Grupo de Trabajo sobre refinamiento (1993). Este grupo ha llegado a la conclusión de que en el ratón, la amputación de la punta de la cola bajo analgesia es el método de elección para la obtención de muestras sanguíneas, mientras que para la rata, se recomienda la punción de la vena de la cola. El grupo de trabajo no llegó a una conclusión definitiva sobre que método recomendar para la punción venosa en los gerbillos y los hamsters. La punción cardiaca fue el método elegido para las cobayas, pero siempre bajo anestesia / analgesia. La punción retro-orbital es también un método ampliamente utilizado en roedores para la

recolección de sangre (van Herck *et al.* 1991 a). La punción de la vena sublingual ha sido descrita últimamente (Zeller *et al.* 1998), pero este método requiere anestesia general y puede conllevar una reducción de la ingesta de alimentos.

En nuestra opinión todos estos métodos, con la excepción de la utilización de las venas de la cola en el ratón y la rata (Wolfensohn & Lloyd 1994), están por debajo de lo que puede considerarse como óptimo para el bienestar animal. En Noruega, la punción cardiaca, tanto si es para la extracción sanguínea, como para la administración de sustancias, solamente puede realizarse bajo anestesia general y que concluya con el sacrificio final del animal, a menos que se consiga un permiso especial de la Autoridad Nacional para la Investigación Animal (*Norwegian Ministry of Agriculture* 1996).

Rusher y Birch (1975) publicaron un artículo en el que se describía la punción de la vena safena en la rata. Su técnica, sin embargo, necesitaba de dos técnicos y abordaba la vena desde la cara interna del muslo. Otros investigadores han llegado a la conclusión de que esta técnica es de difícil realización y aconsejan la utilización de la sección de la cola como método de elección. (Liu *et al.* 1996).

Nau y Schunck (1993) describen la canulación de la vena safena en cobayas anestesiados.

Nosotros describimos lo que consideramos un método sencillo de punción venosa, que puede ser empleada en gran variedad de especies, incluyendo el ratón, sin que haya necesidad de utilizar anestesia. Algunos detalles ya se han descrito sucintamente con anterioridad (Solberg 1988, Aaberge *et al.* 1992).

Materiales y métodos

Inmovilización del animal

La técnica emplea la vena safena lateral, la cual discurre primero por la cara caudal (posterior) de la extremidad posterior y luego lateralmente sobre la articulación del tarso. Dependiendo de la especie de la que se trate, se puede utilizar una gran variedad de técnicas de inmovilización. Los animales que previsiblemente no muerden, como la rata o el visón, pueden ser inmovilizados simplemente con la mano por el técnico, o bien envolviéndolos, sin apretarles, con un paño de laboratorio o una toalla (Fig. 1).

La sedación no es necesaria en la venopunción de la safena, pero puede utilizarse en beneficio del bienestar animal, o en especies que son difíciles de inmovilizar como el gerbillo y el hámster. Alternativamente, el uso de los sedantes puede limitarse al momento de afeitar la piel situada sobre la vena, lo cual sólo deberá ser repetido cuando el pelo vuelva a crecer. La vena es a menudo tan visible, que puede que no sea necesario afeitar la extremidad, aunque sí puede ser una ventaja limpiar la zona con etanol al 70 %. Pueden emplearse sedantes que contengan vasodilatadores periféricos, como el



Fig. 1. Método de Inmovilización manual previa a la venopunción de la safena (RATA)

Hypnorm® (0,315 mg/ml fentanilo y 10 mg/ml fluanisona; Janssen, Bélgica) muy utilizado en los laboratorios europeos para roedores (Flecknell 1996), aunque a dosis bajas para evitar sangrados prolongados en el lugar de la punción. También pueden utilizarse como inmovilizadores, tubos de plástico transparente de un diámetro adecuado (Fig. 2). Para ratones pequeños, puede ser suficiente un tubo de centrifugado practicándole una serie de orificios en la punta del tubo para favorecer la respiración del animal. Para animales más grandes, se pueden utilizar tubos o cepos de plástico de varios diámetros. Estos cepos, son unos tubos con una serie de ranuras transversales a lo largo del mismo y una tapa perforada para permitir la respiración del animal, que, según en la ranura en la que se coloque, sirve para poder inmovilizar animales de diferentes tamaños. Hay cepos disponibles comercialmente para ratas adultas (B & K Universal, Hull, Inglaterra). Todos los sistemas de inmovilización deben lavarse frecuentemente, tanto para prevenir infecciones cruzadas, como para evitar el estrés inducido por las feromonas de otros animales.

La otra mano del técnico ha de utilizarse para inmovilizar en posición extendida el miembro posterior del animal, aplicando una ligera presión hacia abajo, justo por encima de la articulación de la rodilla. Este movimiento sirve además para estirar la piel de encima del tobillo, haciendo más fácil el afeitado y la inmovilización de la vena safena, la cual es bastante móvil en muchas especies. El sitio preferido para la punción venosa puede variar

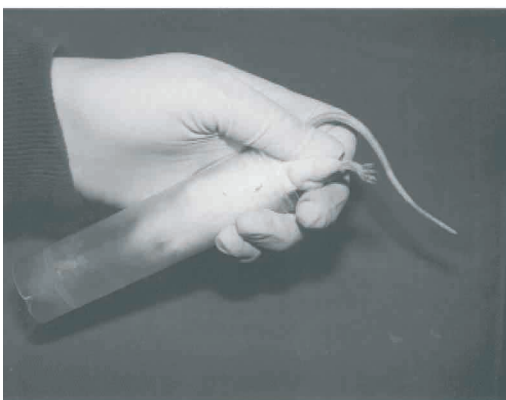


Fig. 2. Uso de un tubo para la inmovilización del ratón previa a la venopunción de la safena

dependiendo del técnico y de la especie de la que se trate. A menudo la vena safena es visible tanto por encima como por debajo de la articulación del tobillo.

Preparación de la zona para la extracción sanguínea

Para afeitar el área de la articulación del tarso, se confeccionó un pequeño instrumento. Se retiró la envoltura (normalmente de aluminio) de una hoja de bisturí del número 11 (Swann-Morton Ltd, Sheffield, Inglaterra) y se enrolló alrededor de la hoja para formar un mango. La ventaja de no utilizar el mango tradicional del bisturí, es que la envoltura puede curvarse, para ajustarse a la presión que el operador realiza entre sus dedos pulgar e índice. Este instrumento se utiliza para afeitar la zona lateral y caudal (posterior) alrededor de la articulación del tobillo, realizando un suave movimiento en la dirección del pelo. Hay que tener cuidado en colocar la hoja casi paralela a la piel, para evitar cortarla. La vena safena es visible en seguida, inmediatamente por debajo de la piel. Puede extenderse un poco de gel de silicona (Stopcock grease, Dow Corning, Midland, MI, USA) en el lugar de la punción antes de realizarla, para así reducir el riesgo de que se coagule la sangre al entrar en contacto con la piel. No obstante, a menudo esto es innecesario si la punción de la vena se hace correctamente y si se aplica la compresión y éstasis venosa suficiente para que la sangre continúe fluyendo.

Punción de la vena safena

Pueden utilizarse varios métodos para la punción venosa, dependiendo del tamaño del animal, el número de muestras sanguíneas que vayan a obtenerse y el tipo de muestra sanguínea que se necesite. Se debe utilizar aquel calibre de aguja más pequeño que posibilite una evacuación de la sangre suficientemente rápida. En la mayoría de los casos, es más adecuado utilizar una aguja estéril. El diámetro de la aguja que se va a utilizar depende del diámetro de la vena del animal en cuestión. Para los ratones, a menudo se consigue una punción adecuada utilizando una aguja de 25 G (0,6 mm).

Cuando se realiza correctamente, se forma inmediatamente una gota de sangre en el lugar de la punción. Existe un variado muestrario de

sistemas para recoger la muestra sanguínea, dependiendo de la cantidad y de las características específicas de la muestra. Como norma general, puede extraerse hasta un volumen de sangre equivalente al 0,5 % del peso corporal del animal de una sola vez (Wolfensohn & Lloyd 1994) y esto puede repetirse en intervalos de dos semanas sin perjuicio para los valores hematológicos del animal. Las muestras que vayan a tomarse diariamente no han de superar el 0,05 % del peso corporal.

Para pequeñas muestras, puede utilizarse un capilar de hematocrito de 50 a 100 μ l (Fig. 3), que se rellenará de sangre sosteniéndolo contra la gota que se forma sobre la piel. El final del capilar debe sellarse con arcilla o plastilina.

Para muestras grandes, pueden utilizarse los tubos de recolección Microvette (Sarstedt, D-51588 Numbrecht, Alemania, www.sarstedt.com). Están sellados por una tapa de plástico y pueden centrifugarse en un cabezal para tubos Eppendorf. En otros casos se pueden rellenar consecutivamente varios tubos de hematocrito. Todos estos tubos se encuentran disponibles con o sin anticoagulante.

Si se presiona levemente el lugar de la punción, o simplemente con la relajación de la presión que realizaba el técnico sobre la extremidad trasera, normalmente es suficiente para detener el sangrado. El tiempo de inmovilización del animal debe reducirse al mínimo posible, en pos de su bienestar. Esto reduce, así mismo, el riesgo de un sangrado excesivo del animal debido al aumento de la presión sanguínea por estrés.

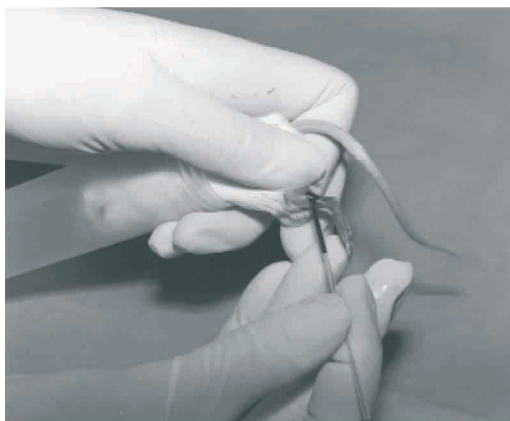


Fig. 3. Recogida de una muestra de sangre de la vena safena mediante el uso de un tubo de hematocrito

Posteriormente puede retirarse la costra que se forma en el lugar de la punción, reanudando el sangrado, lo que posibilitará la toma seriada de muestras. Hemos utilizado con éxito este método para tomar más de 10 muestras seriadas en un ratón durante un periodo de 24 horas.

Discusión

La punción de la vena safena es un método rápido y fiable para la obtención de muestras sanguíneas en un gran número de especies. La situación superficial de la vena permite asegurar que la punción ha sido correcta y permite una fácil observación de cualquier hemorragia posterior a la obtención de la muestra. En nuestra opinión, puede ser utilizada en sustitución de otras técnicas como, por ejemplo, la punción cardiaca y la punción retro-orbital. Elimina la necesidad de anestesia y el riesgo de la reducción de la ingesta asociada a la punción de la vena sublingual. La parte más crítica de la técnica es el afeitado del área de la articulación tarsal antes de la toma de muestras, por el riesgo de cortar la piel. Sin embargo, esto puede ser enseñado rápidamente por personal especializado y ser practicado con animales sedados. Muchas técnicas alternativas de obtención de muestras sanguíneas implican sedación o anestesia del animal. Si la utilización de una inmovilización farmacológica no interfiere en el protocolo experimental, puede utilizarse para eliminar cualquier riesgo de que el animal sea herido accidentalmente, particularmente antes de que el personal esté familiarizado con la técnica. Puede utilizarse una maquinilla eléctrica para afeitar al animal siempre que el ruido no le asuste.

La toma retro-orbital de muestras en los ratones y las ratas está descrita en la literatura.

Investigadores holandeses publicaron que la punción retro-orbital no representa un estrés adicional para los ratones que son anestesiados para dicho procedimiento (van Herck *et al.* 1991a.). Sin embargo, el estudio empleó como anestesia el éter, que en sí mismo es un potente estresante (Gärtner 1980) y puede enmascarar un estrés adicional causado por la punción retro-orbital.

Los autores observaron un retraso en la regresión a valores normales de los niveles

plasmáticos de noradrenalina, lo que les llevó a considerar que puede ser debido al daño tisular causado por la técnica. Posteriormente, publicaron que se habían observado en las ratas cambios histológicos en la región orbital después de la punción. (van Herck *et al.* 1991 b) Estas incluían hemorragias y reacciones inflamatorias en el área de la punción, en el periostio retro-orbital, en los músculos oculares y en la glándula de Harder. En Noruega la anestesia de los roedores de laboratorio con éter está prácticamente en desuso y está siendo reemplazada por fármacos inyectables, como por ejemplo una mezcla de fentanilo - fluanisona - midazolán (Hypnorm® + Dormicum®) o anestésicos inhalatorios como el halotano o el isoflurano (Flecknell 1996).

Cuando esta técnica se introduce en un laboratorio, es importante considerar el tamaño de la aguja que se va a utilizar para la punción de la vena. Basándose en un índice de malestar (Barclay *et al.* 1988), existen evidencias de que agujas de un calibre algo mayor no producen un aumento del estrés en las ratas y los ratones, en cambio, pueden disminuir el tiempo de manipulación, gracias a que facilitan una salida más rápida de la sangre.

Agradecimiento: Al personal técnico del Trude Olsen, National Institute of Public Health de Oslo por su colaboración en el refinamiento de esta técnica.

Bibliografía

- Aaberge IS, Michaelsen TH, Rolstad AK, Groeng EC, Solberg P, Lovik M (1992) SCID-Hu mice immunized with a pneumococcal vaccine produce specific human antibodies and show increased resistance to infection. *Infection and Immunity* **60**, 4146 - 53
- Barclay RJ, Herbert WJ, Poole TB (1988) *Disturbance Index Method for Assessing Severity of Procedures on Rodents*. Potters Bar: Universities Federation for Animal Welfare.
- BVA/FRAME/RSPCA/UFPAW Joint Working Group on Refinement (1993) Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals* **27**, 1-22
- Flecknell P (1996) *Laboratory Animal Anaesthesia*, 2nd edn. London: Academic Press
- Gärtner K, Büttner D, Döhler K, Friedel R, Lindena J, Trautschold I (1980) Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Laboratory Animals* **14**, 267-74

- Liu JY, Teodoro GD, Jaydutt VV, Henry JP (1996) Tail sectioning: a rapid and simple method for repeated blood sampling of the rat for corticosterone determination. *Laboratory Animal Science* **46**, 243-5
- Nau R, Schunck O (1993) Cannulation of the lateral saphenous vein—a rapid method to gain access to Blood collection from the saphenous vein the venous circulation in anaesthetized guineapigs. *Laboratory Animals* **27**, 23-5
- Norwegian Ministry of Agriculture (1996) *Regulations on Experiments with Animals*, paragraph 14, with effect from 1 February 1996
- O'Neill PJ, Kaufmann LN (1990) Effects of indwelling arterial catheters or physical restraint on food consumption and growth patterns of rats: advantages of non-invasive blood pressure measurement techniques. *Laboratory Animal Science* **40**, 641-2
- Rusher DL, Birch RW (1975) A new method for rapid collection of blood from rats. *Physiology and Behavior* **14**, 377-8
- Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Ltd
- Sarlis NJ (1991) Chronic blood sampling techniques in stress experiments in the rat—a mini review. *Animal Technology* **42**, 51-9
- Solberg P (1988) Blodtapping pa mus (*Blood sampling of mice*). NFS-nytt **4**. 1 page. National Laboratory Animal Centre, National Institute of Public Health, Oslo, private publication
- van Herck H, Baumans V, de Boer SF, van der Gugten J, van Woerkom AB, Beynen AC (1991) Endocrine stress response in rats subjected to singular orbital puncture while under diethyl-ether anaesthesia. *Laboratory Animals* **25**, 325-9
- van Herck H, Baumans V, van der Craats NR, et al. (1991b) Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture. *Laboratory Animals* **26**, 53-8
- Wolfensohn S, Lloyd M (1994) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. Oxford: Oxford University Press
- Zeller W, Weber H, Panoussis B, Bürge T, Bergmann R (1998) Refinement of blood sampling from the sublingual vein of rats. *Laboratory Animals* **32**, 369-76

Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio



La Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), se constituyó en 1989, con carácter exclusivamente científico y sin ánimo de lucro.

Los objetivos principales de la SECAL son racionalizar y mejorar la utilización, el conocimiento y la protección del Animal de Laboratorio al servicio de la salud del hombre y de los animales, procurando que los miembros de la Sociedad ejerzan la profesión con competencia y dignidad, fomentando la relación y cooperación entre los mismos, así como difundir todas las informaciones científicas y técnicas relativas al animal de Laboratorio, a través de la organización de cursos de Formación y el

Congreso Nacional de la Sociedad que se celebra cada 2 años.

Podrán pertenecer a esta Sociedad todas aquellas personas relacionadas profesionalmente con las Ciencias del Animal de Laboratorio.

La SECAL es miembro de FELASA, Federación of European Laboratory Animal Science Associations and de ICLAS, International Council for Laboratory Animal Science. FELASA proporciona un foro único de discusión a través del cual sus miembros pueden expresar un punto de vista europeo colectivo ante Organismos como la Unión Europea, el Parlamento Europeo e ICLAS.

Para conseguir más información sobre la Sociedad, dirigirse mediante internet a la página web:
<http://www.secal.es>

Secretaría de la S.E.C.A.L.:
Facultad de Medicina de la UAM (SECAL), C/ Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid.
Email: secretaria@secal.es, Tel. +34 91 497 54 76, Fax. +34 91 497 53 53.

Laboratory Animals Ltd.

Laboratory Animal Ltd. es una compañía limitada Británica con carácter benéfico no lucrativo, fundada en 1967. Su principal objetivo es la publicación de la revista *Laboratory Animals*.

Laboratory Animals publica artículos, revisados por expertos, acerca de todos los aspectos relacionados con los animales de laboratorio en la investigación biomédica. Se distribuye a más de 50 países siendo la revista oficial de varias sociedades Europeas dedicadas a las Ciencias del Animal de Laboratorio, como: FELASA (Federación of European Laboratory Animal Science Associations) LASA (Laboratory Animal Science Association), GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) ILAF (Israeli Laboratory Animal Forum) NVP (Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde) SECAL (Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio) SGV (Schweizerische Gesellschaft für Versuchstierkunde) y SPCAL (Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de Laboratório).



La compañía publica además monografías dentro de la serie *Laboratory Animals Handbooks*, encargándose de otras actividades, como la aportación de fondos para promover la formación en la tecnología, ciencia y bienestar del animal de laboratorio.

Laboratory Animals Ltd. está comprometida en la difusión de los principios de Russell y Burch sobre el Reemplazamiento, Reducción y Refinamiento, en todos los campos relacionados con el animal de experimentación. Además de la promoción de este concepto a través de la revista y otras publicaciones, otorga becas, financia conferenciantes en reuniones científicas y proporciona material de formación para su distribución a la comunidad científica.

La compañía está regida por un Consejo de Dirección formado por miembros de diferentes países.

Para más información sobre la Compañía o la revista incluyendo el acceso on-line puede dirigirse mediante internet a la dirección:

<http://www.lal.org.uk> o bien por fax al +44 1279 62 2573