

Edición en español de:
Laboratory Animals (2010) 44, 7-16

Laboratory Animals

THE INTERNATIONAL JOURNAL OF
LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND WELFARE

Análisis de parámetros fisiológicos y de comportamiento en ratones después de la amputación de falanges en recién nacidos.

Dagmar C Schaefer¹, Igor N Asner¹, Burkhardt Seifert², Kurt Bürki¹
y Paolo Cinelli¹

¹Instituto de las Ciencias del Animal de Laboratorio; ²Unidad de Bioestadística, Instituto de Medicina Social y Preventiva, Universidad de Zurich, Zurich, Suiza
Dirección para correspondencia: Dr. P. Cinelli, Institute of Laboratory Animal Science, University of Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich, Suiza.
Email: paolo.cinelli@ltk.uzh.ch

Este artículo ha sido traducido por: D^a 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.

Análisis de parámetros fisiológicos y de comportamiento en ratones después de la amputación de falanges en recién nacidos

Dagmar C Schaefer¹, Igor N Asner¹, Burkhardt Seifert², Kurt Bürki¹ y Paolo Cinelli¹

¹Instituto de las Ciencias del Animal de Laboratorio; ²Unidad de Bioestadística, Instituto de Medicina Social y Preventiva, Universidad de Zurich, Zurich, Suiza

Dirección para correspondencia: Dr. P. Cinelli, Institute of Laboratory Animal Science, University of Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich, Suiza. Email: paolo.cinelli@ltsk.uzh.ch

Resumen

En este estudio hemos investigado el impacto a largo y corto plazo de la amputación de falanges, un método comúnmente utilizado para marcar a las crías y para tomar biopsias, y a su vez fuente de discusión y controversia por sus efectos potencialmente negativos en los animales. Además, hemos analizado aspectos relacionados con el bienestar de los animales tales como la salud, comportamiento, desarrollo, estrés y efectos perjudiciales en animales jóvenes y adultos tras la amputación de falanges en los días 3 (P3) y 7 (P7) postnatales. Nuestros hallazgos indican que para las amputaciones en la segunda falange de un dedo de cada extremidad, tanto en crías P3 como P7, no hay ningún efecto negativo ni en el crecimiento ni en el desarrollo físico, y que las crías amputadas no sufren rechazo por parte de la madre. Nuestros datos indican que, a pesar de que en ninguna de las dos edades se han detectado anomalías histológicas, la amputación en P7 es la edad preferible para el marcado, fundamentalmente debido al pequeño tamaño de los dedos en P3. Esto también fue confirmado por el test de agarre a la edad de 12 semanas, en el que los animales P3 tenían menos fuerza de agarre que los animales de control, mientras que las crías P7 no mostraron ningún tipo de discapacidad. El test de "hotplate" indicó que la amputación de falanges realizada entre P3 y P7 no provocaba hiperalgesia en el muñón amputado. Los análisis de corticosterona en suero llevados a cabo directamente en crías P7 después de la amputación indicaban que el estrés era provocado principalmente por la manipulación y no por la amputación en sí. El análisis conjunto de estos datos lleva a la conclusión de que la amputación de falanges en ratones recién nacidos es desde un punto de vista morfológico, fisiológico y del bienestar un método aceptable de marcado y genotipado

Palabras clave: amputación de falanges, dolor, corticosterona, test de agarre, test del "hotplate"

La adecuada identificación de los animales es uno de los pasos más críticos a la hora de trabajar con animales de laboratorio, ya que es la única conexión entre el animal y todos sus datos: genotipo, muestras y resultados de las investigaciones. La amputación de falanges se practica habitualmente en todo el mundo, pero aún es un método de identificación animal que plantea mucha controversia. Permite la identificación permanente de ratones recién nacidos y al mismo tiempo proporciona una cantidad suficiente de tejido para el genotipado, presentando por tanto ventajas sobre otros métodos de marcado habituales que subjetivamente se consideran menos estresantes para los animales^{1,2}, como el tatuaje o la implantación de microchips, pero que no proporcio-

nan ninguna biopsia. Normalmente los animales son genotipados a la edad del destete mediante biopsia de la cola y corte de orejas, pero para procedimientos experimentales que incluyen trabajo con ratones recién nacidos, hay muy pocas opciones disponibles para realizar el marcado y la biopsia simultáneamente. En estos casos suele combinarse un método de marcado no permanente con una biopsia de cola.

A pesar de la controversia que la rodea¹⁻⁴, la amputación de falanges presenta muchas ventajas. Es rápida, fácil de aplicar, no requiere anestesia ni analgesia y es barata. Además, es una técnica fácil de aprender y realizar, y ofrece muchas posibilidades dependiendo de qué combinación se utilice. Aunque la amputación de falanges es un método legalmente

aceptado, existe una gran preocupación por el supuesto dolor que pueda provocar en los recién nacidos y por los posibles efectos perjudiciales a largo plazo, como alteraciones en la capacidad de agarre o hiperalgesia. Como consecuencia, en muchos procedimientos normalizados de trabajo en todo el mundo¹⁻³ se especifica que la amputación de falanges sólo debe llevarse a cabo en caso de que ningún otro procedimiento sea viable, y sólo en neonatos. No obstante, debido a sus numerosas ventajas es de suponer que este método podría también aplicarse como un procedimiento normalizado para el marcado de animales. Ya que no existe ningún estudio explícito sobre las consecuencias de la amputación de falanges a largo y corto plazo en el bienestar de los animales, es necesario analizar claramente los cambios fisiológicos y de comportamiento en ratones amputados con el objetivo de determinar definitivamente si este método es aceptable o si su práctica debería reducirse a casos excepcionales.

Las investigaciones hasta la fecha se han centrado principalmente en la presencia y grado de neoformación ósea después de la amputación de la punta del dedo en ratones recién nacidos.⁵⁻¹¹ Estos estudios indicaban que la respuesta de regeneración ósea es a nivel específico de la falange terminal y que la punta neoformada del dedo era morfológicamente normal, pero más corta que en los dedos control. Neufeld y Zao⁸ demostraron que sólo la amputación a nivel proximal de la primera falange impide el recrecimiento de la punta amputada.

Hasta la fecha sólo se conocen dos estudios que hayan investigado la amputación de falanges como método de identificación en ratones. Kumar¹² argumentó que la amputación de falanges podía llevarse a cabo sin anestesia en crías de 14 días (P14) causando mínimas molestias. Sus conclusiones se basaron en la observación de que las crías empezaban a mamar de nuevo pasados unos minutos. Vachon¹⁰ se centró únicamente en los efectos secundarios perjudiciales a largo plazo relacionados con el crecimiento óseo y remodelación tisular, y llegó a la conclusión de que la amputación de dedos (realizada en P14) es un procedimiento aceptable para la identificación numérica de ratones. A pesar de que ambos estudios describen la amputación de falanges como un procedimiento válido, se ha prestado demasiada poca atención al bienestar animal, y no se ha publicado ningún estudio que analice la posible presencia e intensidad del dolor y estrés producido

por la amputación de falanges en la primera semana tras el nacimiento y sus posibles efectos a largo plazo.

Resulta muy difícil determinar objetivamente la presencia de dolor y estrés en ratones, en especial en el caso de que sean sólo moderados. Por lo general, los ratones muestran pocos signos de sufrimiento. Durante un experimento, especialmente si hay alguna persona presente en la habitación como observador, el ratón ocultará cualquier muestra de dolor.¹³⁻¹⁵ Por lo tanto, la monitorización del dolor leve a moderado mediante la simple observación de los animales es muy complicada. Los métodos tradicionales como la medición de niveles de corticosterona en la sangre implican la manipulación del animal, lo que produce estrés y puede, por tanto, influir en los resultados obtenidos, a menos que el animal sea sacrificado inmediatamente. Dado que las crías atraviesan un periodo de receptividad reducida del eje pituitario-adrenal durante el desarrollo temprano postnatal, caracterizado por niveles muy bajos de corticosterona basal e incapacidad de muchos estímulos de provocar una respuesta en los niveles de corticosterona,¹⁶⁻¹⁸ resulta muy difícil medir cambios en los niveles de corticosterona durante los primeros días postnatales.

Recientemente se han desarrollado nuevas metodologías para la evaluación objetiva del dolor y el estrés en animales. Una de ellas es la telemetría, que permite la medición simultánea de parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca, la temperatura corporal interna o la presión sanguínea. Esta tecnología se ha empleado de forma satisfactoria para la evaluación del dolor posterior a la laparotomía¹⁹ y para la detección del impacto de biopsias de diferentes tejidos para el genotipado de ratones de laboratorio.²⁰ Sin embargo, debido al tamaño del transmisor, esta tecnología no puede utilizarse con ratones recién nacidos.

En el presente trabajo hemos analizado el impacto fisiológico y comportamental de la amputación de falanges en ratones en los días 3 (P3) y 7 (P7) postnatales. Hemos realizado mediciones de corticosterona, analizado cambios en los parámetros fisiológicos, así como el comportamiento de las madres hacia las crías amputadas. Así mismo fueron evaluados los efectos a largo plazo de la amputación de falanges mediante estudios histológicos y de comportamiento en animales adultos que habían sido amputados en P3 y P7.

Materiales y métodos

Animales y condiciones de alojamiento

Ratones B6D2F1 machos y hembras reproductores de 6-8 semanas fueron proporcionados por RCC (Research and Consulting Company, Biotechnology and Animal Breeding Division, Füllinsdorf, Suiza). Los ratones estaban libres de patógenos virales, bacterianos o parasitarios recogidos en las recomendaciones de la Federación de Asociaciones Europeas de Animales de Laboratorio.²¹ Los animales se mantuvieron en cubetas de plástico tipo III (425x266x150 mm, área de la base 820 cm²) con un lecho de viruta esterilizada libre de polvo (80-90 g por jaula) (Schill AG, Mutenz, Suiza), pañuelos de papel esterilizados (2 por jaula) y una casa de papel como materiales para el nido. Se les alimentó *ad libitum* con una dieta para ratones en forma de pellets (Kliba n° 3431, Provimi Kliba, Kaiseraugst, Suiza), y con libre acceso a agua esterilizada. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12/12 horas, con luz artificial (40 lux en la jaula) de 07:00 a 19:00 h. La temperatura fue de 21±1°C, con una humedad relativa del 50±5% y con 15 renovaciones completas de aire filtrado por hora (filtro HEPA H 14, Vokes-Air, Uster, Suiza). La presión estuvo controlada a 50 Pa. Los estudios fueron aprobados por la Oficina Cantonal Veterinaria (Zurich, Suiza). Los procedimientos experimentales y de alojamiento estaban de acuerdo con la ley suiza de protección animal, y conformes con la Convención Europea para la protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos (Consejo de Europa n° 123, Estrasburgo 1985).

Los animales utilizados como reproductores tuvieron un periodo de adaptación de dos semanas tras su llegada al animalario. El celo fue inducido mediante el efecto Whitten. Los animales se emparejaron en base a un macho por hembra por cubeta. El primer día la cubeta fue compartimentada para que el macho no tuviera acceso a la hembra, pero sí contacto olfativo. El tercer día se eliminó la división y en la mañana del cuarto día se inspeccionó a la hembra para comprobar la presencia de tapón vaginal y, en el caso de haberlo, fue separada cada hembra en una cubeta individual.

Amputación de falanges

Se practicó la amputación parcial en la segunda falange de los dedos en crías neonatas de diferentes

edades. Llevamos a cabo el experimento con dos grupos: el grupo 1 (P3, P7; $n = 120$) fue utilizado para el análisis de parámetros fisiológicos y del comportamiento a corto y largo plazo; el grupo 2 (p7, $n = 150$) se utilizó para la determinación de corticosterona en suero y por tanto fue sacrificado poco después de la amputación.

En cada grupo, se utilizó el 50% de la camada como animales de control, que fueron sometidos a las mismas manipulaciones y limitaciones que al resto, y con los que se imitó la amputación cerrando unas tijeras junto a cada pata.

Para el proceso de amputación, se sacó a la camada entera (grupo 1) o animales por separado (grupo 2) fuera del nido y se los colocó en una cubeta extra forrada con pañuelos de papel. Cada cría se sostuvo sobre una porción de papel y se inmovilizó mediante suave presión. Se cortó la segunda falange, en tres dedos, uno por pata, escogidos de forma aleatoria en las patas delanteras (exceptuando los pulgares) y en uno, específicamente seleccionado (de acuerdo con un sistema de numeración del 1 al 10), en una de las patas traseras. Los dedos se conservaron en formalina al 4% para análisis morfológicos o en hielo para genotipado.

Se utilizaron tijeras de microcirugía muy afiladas (Vannas Spring Scissors, cuchillas de 4 mm, rectas, de FST, Heidelberg, Alemania). Después de usarlos con cada animal, los instrumentos se limpiaron con alcohol. No se utilizó anestesia ni analgesia. Tampoco se utilizó ningún método específico de homeostasis, ya que no hubo pérdidas de sangre sustanciales. Después de haber realizado las apuntaciones a toda la camada (grupo 1) o un único animal (grupo 2), los animales se devolvieron a la cubeta nido con su madre.

Análisis del desarrollo/observaciones del comportamiento a corto plazo

Los animales del grupo 1 y sus madres fueron observados inmediatamente, 1, 3, 5, y 12 horas después de la amputación y posteriormente a diario durante tres semanas con la ayuda de una hoja de recogida de datos especialmente diseñada para ello, y basada parcialmente en estudios anteriores.^{22,23} Se pesó a las crías a diario durante tres semanas, procedimiento durante el cual la camada se mantuvo separada de la madre (siempre dentro del campo auditivo) durante un máximo de 10 minutos.

Toma de muestras de suero y análisis de corticosterona

Las crías P7 fueron sacrificadas entre las 12.00 y las 14.00 horas por decapitación, 7 minutos (tiempo adecuado para la determinación de corticosterona que fue calculada en un experimento anterior, del que no se aportan datos) después de la amputación o únicamente de la manipulación (grupo control no amputado [NA]), y se recogió sangre del tronco. Se recogió y mezcló al mismo tiempo, sangre de cinco animales (del mismo sexo) para asegurar la recolección de una cantidad adecuada de suero, en un total de 25 animales para cada una de las cuatro categorías (amputados, NA, machos y hembras). La sangre se dejó coagular a 4 °C durante una hora y después fue centrifugada a 8000 rpm durante 6 minutos, y el suero se conservó a -20 °C para posterior inmunoensayo enzimático (IEE). Los niveles de corticosterona en suero fueron medidos utilizando un kit competitivo de IEE con una sensibilidad de 0,17 ng/mL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Corticosterone HS EIA, Immunodiagnostic Systems, Frankfurt am Main, Alemania).

Valores basales

Se determinaron asimismo los valores basales de corticosterona para las crías P7 no amputadas. Cada animal fue sacrificado mediante decapitación en los 10 segundos posteriores a su retirada del nido. Se recogió y mezcló al mismo tiempo sangre de cinco animales (del mismo sexo) con un total de 25 animales para cada sexo. Los niveles de corticosterona en el suero se determinaron como se ha descrito anteriormente.

Test de comportamiento para la evaluación de los efectos a largo plazo en la fuerza de agarre e hiperalgesia

Ambos test se realizaron con ratones del grupo 1 de 12 semanas de edad en dos días consecutivos. Se retiró a cada animal de la cubeta sin que el experimentador fuera consciente de a qué grupo pertenecía. Para el test de "hotplate", utilizamos un grupo de control adicional ($n = 20$) de ratones que no habían sido sometidos a manipulación neonatal.

(A) Test de agarre

El test de agarre se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.^{24,25} El sensor de la fuerza de agarre

se dispuso horizontalmente y el ratón se sostuvo por la cola y se hizo descender hasta el aparato. Se le permitió agarrar (sólo con las patas delanteras) la barra triangular de metal conectada a un indicador de fuerza de tracción (3 N, AWYCO AG, Olten, Suiza) y después se tiró de él hacia atrás de forma horizontal. Se anotó la fuerza aplicada a la barra en el momento de soltarla como tensión máxima (N). El test se repitió cinco veces consecutivas y se recogieron los 5 valores para cada animal. Los ratones no habían sido entrenados antes, y cada ratón hizo la prueba una vez.

(B) Test del hot-plate^{26,27} para la detección de hiperalgesia

Cada animal se sostuvo por la cola, fue retirado de la cubeta y se dejó caer desde una altura de aproximadamente 10 cm sobre la superficie caliente (delimitado por un cilindro plástico), que se calentó hasta una temperatura constante de 52 ± 1 °C. El experimentador activó un cronómetro cuando el ratón entró en contacto con la superficie del plato y detuvo la medición tan pronto como se produjo una respuesta (saltos, lamerse las patas traseras o delanteras o sacudir las), y se tomó nota de la latencia de la respuesta, tras esto, se retiró al animal de forma inmediata. Se decidió un tiempo límite de 30 segundos. Cada animal se sometió a la prueba una vez.

Análisis histológico

Para el análisis histológico de los muñones amputados en ratones adultos (grupo 1) se utilizaron las siguientes técnicas de tinción: coloración con hematoxilina-eosina parafina^{28,29} y rojo alizarina S/ azul alcian 8 GS (Division Chroma, Münster, Alemania) en tinción total del esqueleto.³⁰

Análisis estadísticos

Todos los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Se llevó a cabo un análisis estadístico para validar los resultados del test de agarre, test del "hotplate" y de los análisis de corticosterona (SPSS 16.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois, EE.UU.) Se aplicó la prueba de *t-Student* de dos colas para muestras independientes y comparar los valores obtenidos para los diferentes grupos en los test de comportamiento. Fue empleada la corrección de Bonferroni, y para el test de agarre se consideraron significativos los valores $P \leq 0,0125$, mientras

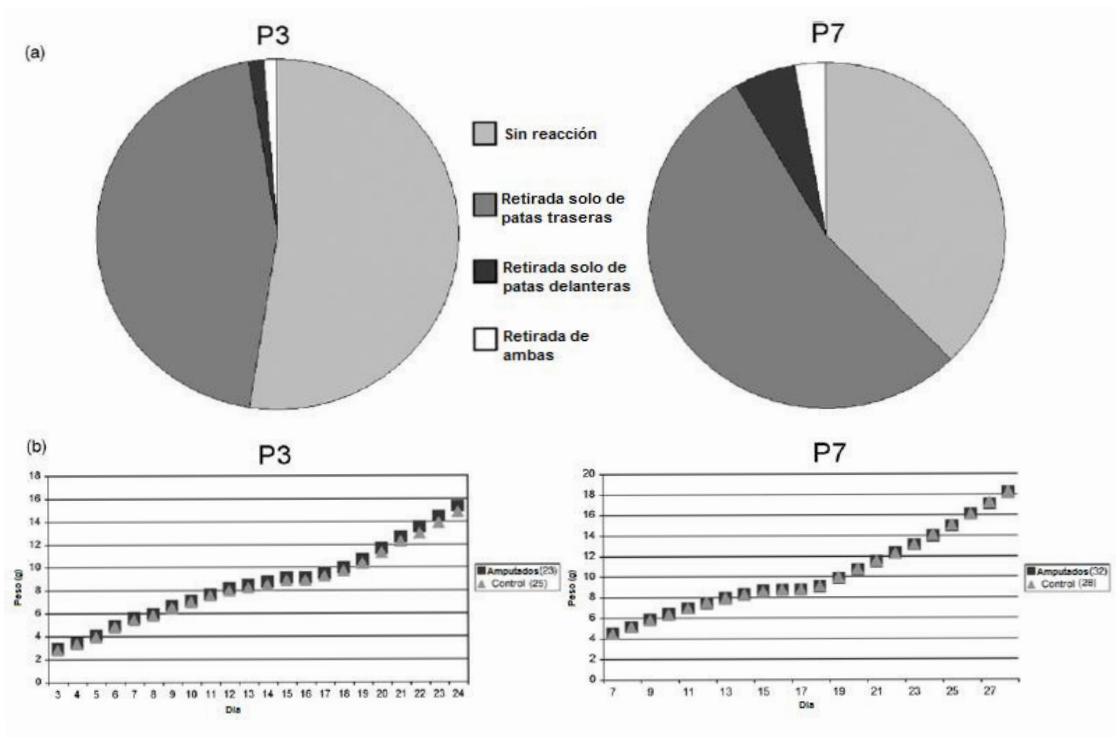


Figura 1 (a) La retirada de las patas es una respuesta frecuente a la amputación de falanges. Se evaluó a un total de 85 animales (P3) y 137 animales (P7). (b) Desarrollo medio del peso a lo largo de tres semanas de las crías amputadas comparadas con los animales de control.

que para el del “hotplate” se consideraron significativos los valores $P \leq 0,0062$. Se realizó una transformación logarítmica para los valores de corticosterona, y se llevaron a cabo análisis de la varianza con los factores género y grupo, con comparaciones a posteriori corregidas por Bonferroni

Resultados

Parámetros fisiológicos y de comportamiento

La reacción inmediatamente posterior a la amputación fue muy similar para las crías P3 y P7. Durante la amputación, el 48,2% de las crías P3 ($n = 85$) y el 39,4% de las crías P7 ($n = 137$) no mostraron ninguna reacción visible, el resto mostraron esporádicamente retirada de las patas, sobre todo en una o las dos de las patas traseras (Figura 1a). No hubo hemorragia sustancial, las manchas de sangre apenas eran visibles en los pañuelos de papel.

Después de volver a poner a los animales en el nido, la madre empezó a acicalarlos sin diferenciar de ningún modo a las crías amputadas de las del

grupo de control. No tuvieron lugar ni fenómenos de canibalismo por parte de la madre, ni automutilación, inflamación u otras anomalías. La madre tuvo en todo momento a las crías dentro del nido, y siempre eran visibles gotas de leche en la piel sin pelaje. El desarrollo de todas las crías se desarrolló correctamente. La evolución fisiológica del pelaje, dientes,

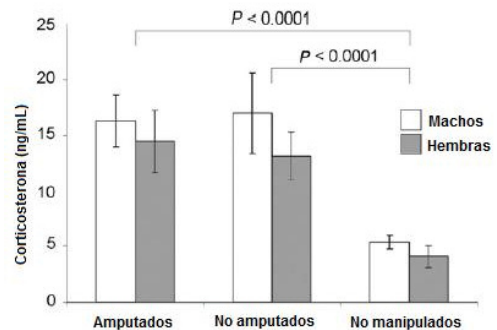


Figura 2 Niveles de corticosterona en suero de las crías P7 después de la amputación/manipulación comparados con los niveles basales de las crías no manipuladas. El margen de error muestra las medias \pm DE

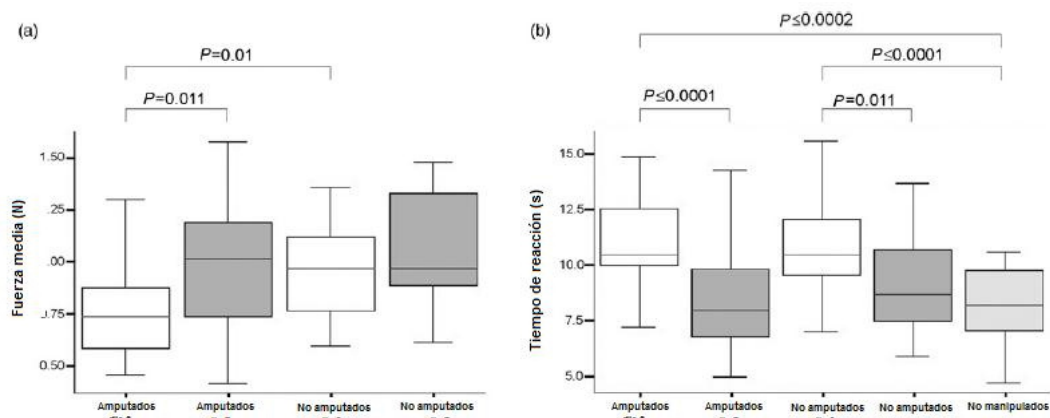


Figura 3 (a) Resultados del test de agarre para los grupos experimentales P3 (n = 60) y P7 (n = 60) con animales amputados y no amputados (control) respectivamente; tras la corrección de Bonferroni, los valores $P \leq 0,0125$ son significativos. (b) Resultados del test del "hotplate" que incluyen un grupo adicional de ratones no manipulados (n = 20) para controlar los efectos de la manipulación o de la separación de la madre; tras la corrección de Bonferroni, los valores $P \leq 0,0062$ se consideran significativos.

orejas, ojos y caminar fue positiva en todas las crías. El desarrollo del peso después de las tres semanas era el mismo para los animales amputados y para los de control (Figura 1b).

Análisis de corticosterona

Los valores de corticosterona en suero (Figura 2) eran un 25% más elevados en las crías macho que en las hembras ($P = 0,002$). Se pudo apreciar un insignificante aumento del 3% (95% intervalo de confianza (IC) -16% a +27%) en los animales amputados respecto de los NA. Tanto los amputados como los NA tenían niveles considerablemente ele-

vados de corticosterona (3,3 y 3,2 veces superior, respectivamente; $P < 0,0001$) comparados con los animales no manipulados (NM) (valores basales medios \pm DE: ♂5,33 \pm 0,92 ng/mL, ♀4,07 \pm 0,62 ng/mL).

Test de comportamiento

El test de agarre (Figura 3a) reveló que los animales amputados (A) en P3 tenían una fuerza significativamente menor en las patas que aquellos amputados en P7 ($P = 0,011$). (Media \pm DE: P3^A 0,78 \pm 0,23 N; P7^A 0,98 \pm 0,30 N.)

Sin embargo, los grupos NA de cada edad no mos-

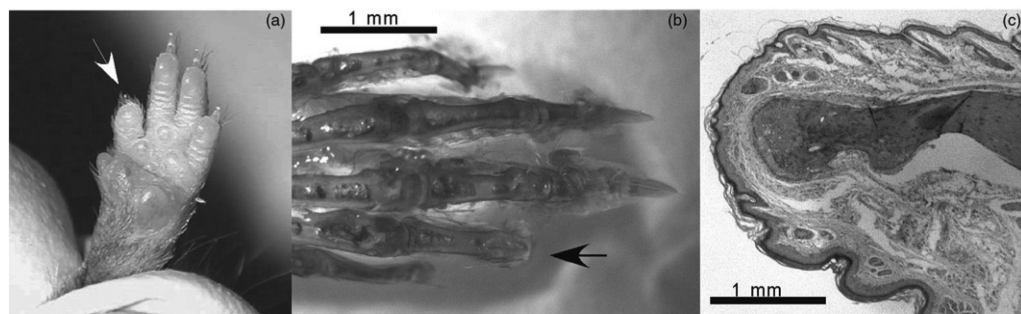


Figura 4 (a) Pata delantera de un ratón de 12 semanas de edad al que se le había amputado un dedo en P7 (flecha blanca). (b) Tinción ósea con rojo de alizarina S/azul alcian de la pata de un ratón de 12 semanas de edad que fue amputado en P7 (flecha negra). (c) Sección de la punta de un muñón amputado teñida con hematoxilina-eosina. Una regeneración de dermis y epidermis bien desarrollada cubre la superficie del muñón, y la cavidad medular de la falange está cerrada.

traron diferencias significativas (95% IC -0,24 N a 0,03 N; media \pm DE: P3^{NA} 0,99 \pm 0,23 N; P7^{NA} 1,06 \pm 0,26 N). Comparando los ratones amputados y los NA de cada edad, *P* es 0,01 para los animales P3, pero para los ratones P7 no hay diferencia significativa (95% IC -0,23 N a 0,06 N).

El test del "hotplate" (Figura 3b) mostraba tiempos significativamente mayores para animales P3 amputados (A) comparados con P7 amputados y NA y ratones NM (media \pm DE: P3^A 10,92 \pm 2,44 seg; P3^{NA} 10,76 \pm 2,16seg; P7^A 8,35 \pm 1,04seg; P7^{NA} 9,10 \pm 3,21seg; NM 8,17 \pm 1,77seg). No se encontraron diferencias significativas entre animales P7 amputados y NA (95% IC -1,88 a 0,36seg).

Análisis histológico de los muñones 12 semanas después de la amputación

Las amputaciones de la segunda falange no mostraban regeneración ni hipertrofia ósea, y los huesos del muñón estaban histológicamente bien definidos en su extremo proximal (Figura 4).

Discusión

En este estudio hemos investigado el impacto a largo y corto plazo de la amputación de falanges sobre aspectos del bienestar animal, tales como salud, comportamiento, desarrollo, estrés y efectos perjudiciales en la edad adulta. Nuestros hallazgos demuestran que la amputación de falanges no tiene ningún efecto negativo en el crecimiento y desarrollo físico para las crías P3 ni para las P7, y que las crías amputadas no sufren rechazo por parte de la madre. También podemos confirmar que el tejido de un único dedo es suficiente para el genotipado, incluso para las crías P3 (no se muestran datos). Nuestros resultados han demostrado que las crías deben ser mayores de tres días para su correcto marcado. En el tercer día, los dedos de la cría aún están parcialmente unidos entre sí, lo que dificulta al experimentador un corte preciso. Además, por muy cuidadosamente que los animales hubieran sido amputados en P3, muchos de ellos presentaban muñones muy cortos, lo que reducía de forma significativa la fuerza de agarre de estos animales en la edad adulta, como se muestra en la Figura 3. No obstante, creemos que esto no tiene por qué ser considerado como un grave impedimento para un ratón de laboratorio. En base a esta observación se destaca la importancia de escoger procedimientos de biopsia

y marcado acordes con el tipo de experimento previsto. En el caso de la cría de líneas transgénicas, sería lógico pensar que puede utilizarse cualquier método de biopsia y marcado, pero si por ejemplo deben llevarse a cabo pruebas de comportamiento, donde los dedos y la cola juegan una parte importante (como caminar sobre una barra de equilibrio, el laberinto de agua de Morris o el test de agarre), es esencial decidir si, por ejemplo, la amputación de falanges sería una mejor alternativa a la biopsia de cola, o viceversa. Ambos métodos tienen ventajas y desventajas: en el caso de la amputación de falanges la fuerza de agarre del animal puede verse reducida, y en el caso de la biopsia de cola se pueden suponer afectadas las capacidades natatorias y de equilibrio del ratón. Un estudio reciente en el que se evaluaba la biopsia de cola en ratones de laboratorio³¹ utilizaba un sistema de puntuación para evaluar cualitativamente comportamientos anómalos después del estímulo de la biopsia de cola, y demostraba que, aunque la longitud de la biopsia no tenía un efecto significativo en respuestas de comportamiento, con la edad más animales respondían al estímulo de la biopsia de cola realizada en animales conscientes, y que las respuestas también eran prolongadas. Los efectos a largo plazo de una biopsia de cola en el bienestar animal no han sido investigados concienzudamente, aunque se ha demostrado que seccionar una porción larga de la cola causa hiperalgia termal y mecánica en la parte restante de la misma.³² Son necesarios más experimentos para evaluar claramente, por ejemplo, los efectos a largo plazo de la biopsia de cola en el equilibrio y capacidad de trepar de un ratón.

En algunos casos, observamos que se amputaron partes muy pequeñas del dedo, lo que resultó en un recrecimiento más o menos completo del hueso. En este caso, los dedos amputados eran apenas distinguibles de los NA, haciendo imposible la identificación individual del animal. Esto no sucedía con las crías P7, por lo que recomendamos llevar a cabo la amputación a esta edad. De acuerdo con esto, los resultados del test de agarre (Figura 3) reforzaban nuestra hipótesis previa sobre P7 como la edad más adecuada para llevar a cabo la amputación de falanges, ya que no registramos diferencias significativas en la fuerza de agarre entre animales amputados y el grupo de control de esta edad, mientras que la fuerza de agarre de los animales P3 amputados era significativamente menor comparada tanto con rato-

nes P7 amputados como con P3 NA. Una posible razón podría ser que las crías P3 a menudo presentan muñones muy cortos, como se mencionó previamente.

La retirada de las patas, una respuesta inmediata a la amputación, se observó en una gran cantidad de crías de ambas edades (Figura 1a). Suponemos que esto puede deberse a una característica específica del desarrollo del dolor prenatal. Se sabe que ratas, ratones e incluso niños neonatos muestran comportamientos de dolor basal exagerados comparados con adultos, lo que se asocia con un umbral nociceptivo más bajo y un mayor despliegue de respuestas de comportamiento no específicas.³³⁻³⁵ Por lo tanto, suponemos que este tipo de comportamiento no puede ser considerado como representativo respecto de la intensidad real del dolor, sobre todo porque sólo la mitad de las crías se comportaron de esta manera.

Cuando medimos el nivel de corticosterona subsiguiente a la amputación, como un indicador del estrés y el dolor, tuvimos que considerar una especificidad del organismo recién nacido. Se ha descrito que los ratones neonatos, al igual que las ratas, atraviesan el llamado periodo de hipo-respuesta al estrés debido al desarrollo postnatal del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. Este periodo abarca desde el nacimiento hasta P12. Durante este tiempo, los niveles basales de corticosterona son bajos, y la exposición a estrés moderado no los aumenta.¹⁶⁻¹⁸ Esta observación también se confirmó con nuestros experimentos previos con animales P3 (no se muestran datos). Para los animales amputados en P7 encontramos un aumento significativo (más de tres veces) de corticosterona en suero para las crías amputadas y las del grupo de control comparados con los valores basales de los animales NM. No obstante, no encontramos diferencias significativas entre las crías amputadas y los grupos de control NA pero sí manipulados (Figura 2). Estos descubrimientos nos indican que, antes que nada, las crías sufren estrés provocado por la manipulación, y no por la amputación en sí misma. Está claro, por tanto, que incluso la manipulación inofensiva y de corta duración representa un factor estresante para los ratones recién nacidos, y que la amputación de falanges no es el factor crítico. Ya se había observado una reacción similar durante el análisis del impacto de diferentes métodos para la biopsia utilizada para genotipado.²⁰ Creemos firmemente que a esta edad tan temprana

la medición de corticosterona es un indicador adecuado del estrés y el dolor. Sería interesante analizar la vocalización de las crías durante la amputación de falanges. No obstante, habría que examinar estos datos con mucho cuidado, a fin de evitar malas interpretaciones.

Para determinar si la edad a la que se practica la amputación tiene influencia en el desarrollo de la hiperalgesia, llevamos a cabo el test del "hotplate". Resulta interesante que las crías P3, tanto las amputadas como las únicamente manipuladas, mostraban tiempos de reacción significativamente mayores en dicho test comparado con crías P7 y animales de control no manipulados (Figura 3b). Se ha demostrado que procedimientos crónicos de manipulación estresantes en la etapa postnatal resultan en una hiposensibilidad a los estímulos nociceptivos térmicos mediante la reducción del umbral del dolor.^{36,37} Este fenómeno podría ser la razón por la que observamos este aumento para los ratones P3 pero no para los P7. Se pesó a diario tanto a las crías amputadas como a las de control durante las tres semanas posteriores a la amputación, para lo que fueron separados del nido y de la madre durante unos diez minutos cada día. Obviamente, estas manipulaciones diarias, junto con la ausencia de la madre (que no obstante permaneció dentro del campo auditivo), afectaron más a las crías P3 que a las P7. Este efecto secundario debería tenerse siempre en cuenta al planear experimentos con animales recién nacidos. Por supuesto, esto se debió a nuestro diseño del experimento, y no forma parte de la metodología de la amputación de falanges en sí misma. Cuando se lleva a cabo la amputación de falanges de forma rutinaria, las crías no son pesadas y manipuladas a diario, por lo que la observación de este fenómeno probablemente no se observará. Por último, los resultados obtenidos de los test de agarre y del "hotplate" demostraron que la amputación de falanges en P7 no afecta ni a la fuerza de agarre del animal ni causa hiperalgesia.

En general, concluimos que la amputación de falanges es un procedimiento que produce un corto periodo de estrés a los recién nacidos, pero debido a la manipulación y no a la amputación en sí. Es bastante probable que este método produzca menos estrés para los animales que por ejemplo el tatuaje de los recién nacidos, que requiere un tiempo de manipulación comparable o incluso mayor, dependiendo de la pericia de la persona que lo lleve a cabo. Sin

embargo, esta técnica no se considera problemática desde el punto de vista del bienestar animal, al contrario que la amputación de falanges. En nuestro estudio no observamos ningún efecto perjudicial a largo o corto plazo para los animales, por lo que pensamos que la amputación de falanges es un método aceptable de marcado y genotipado de las crías. Esto abre la posibilidad de utilizar la amputación de falanges como una alternativa a la biopsia de cola, porque permite al mismo tiempo el marcado permanente de los animales y la recolección de tejido para el genotipado. Por lo tanto, la amputación de falanges de crías P7 permite genotipar a los animales dos semanas antes del destete, y la rápida selección de los ratones necesarios para experimentos o cría, reduciendo así los costes de cría. Por último, pero no por ello menos importante, la amputación de falanges en crías P7 es mucho más fácil que la toma de muestras por biopsia de cola en los ratones en edad de destete, ya que la manipulación de crías P7 que no pueden morder es muy sencilla, y como consecuencia el marcado de los animales resulta mucho menos estresante no sólo para el investigador, sino para los animales, que ya no necesitan ser sujetados.

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a Zsuzsanna Pataki, Fabienne Weber, Martin Mörter y Leonardo Mamaril su competente asistencia técnica; a Hans Sigg, Margarete Arras y Philippe Bugnon por sus consejos y conversaciones; a Hanns Ulrich Zeilhofer por proporcionarnos el equipo para el test del de "hotplate" Petra Schwarz por su intervención en el estudio histológico, y a Hans Welzl por sus consejos en el test de agarre.

REFERENCIAS

- 1 National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: National Research Council. USA:* National Academy Press, 1996
- 2 BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFPAW Joint Working Group on Refinement. Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Lab Anim* 2003; **37**(Suppl. 1):S1-49
- 3 Duke University. *Policy on Tail and Toe Clipping in Rodents.* 2004: http://vetmed.duhs.duke.edu/documents/iacuc/pdf/policy_on_tail_and_toe_clipping_of_mice.pdf
- 4 Emory University. *Guidelines for Biopsy Procedures to Facilitate Identification and DNA-Based Molecular Genotyping of Rodents.* 2001: <http://www.emory.edu/IACUC/pdfs/BiopsyPolicy.pdf>
- 5 Zhao W, Neufeld DA. Bone regrowth in young mice stimulated by nail organ. *J Exp Zool* 1995; **271**:155-9
- 6 Borgens RB. Mice regrow the tips of their foretoes. *Science* 1982; **217**: 747-50
- 7 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
- 8 Neufeld DA, Zhao W. Phalangeal regrowth in rodents: post-amputational bone regrowth depends upon the level of amputation. *Prog Clin Biol Res* 1993; **383A**:243-52
- 9 Neufeld DA, Zhao W. Bone regrowth after digit tip amputation in mice is equivalent in adults and neonates. *Wound Repair Regen* 1995; **3**:461-6
- 10 Vachon P. Anatomical and histological observations of fore- and hind limb toes in adult mice after amputations performed at the age of two weeks. *Can J Vet Res* 1998; **62**:311-13
- 11 Masaki H, Ide H. Regeneration potency of mouse limbs. *Dev Growth Differ* 2007; **49**:89-98
- 12 Kumar RK. Toe-clipping procedure for individual identification of rodents. *Lab Anim Sci* 1979; **29**:679-80
- 13 van Sluyters RC, Obernier A. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioural research. *Contemp Top Lab Anim Sci/Am Assoc Lab Anim Sci* 2004; **43**:48-52
- 14 Stasiak KL, Maul D, French E, Hellyer PW, VandeWoude S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci/Am Assoc Lab Anim Sc* 2003; **42**:13-20
- 15 Peterson NC. Assessment of pain scoring. *Contemp Top Lab Anim Sci/Am Assoc Lab Anim Sc* 2004; **43**:74, 76
- 16 Enthoven L, de Kloet ER, Oitzl MS. Differential development of stress system (re)activity at weaning dependent on time of disruption of maternal care. *Brain Res* 2008; **1217**:62-9
- 17 Schmidt MV, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *Int J Dev Neurosci* 2003; **21**:125-32
- 18 Schmidt MV, Levine S, Oitzl MS, et al. Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. *Endocrinology* 2005; **146**:1458-64
- 19 Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasemann HP, Burki K. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Vet Res* 2007; **3**:16
- 20 Cinelli P, Rettich A, Seifert B, Burki K, Arras M. Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab Anim* 2007; **41**:174-84
- 21 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

- 22 Mertens C, Rulicke T. [A comprehensive form for the standardized characterization of transgenic rodents: genotype, phenotype, welfare assessment, recommendations for refinement]. *ALTEX* 2000;**17**:15–21
- 23 van der Meer M, Rolls A, Baumans V, Olivier B, van Zutphen LF. Use of score sheets for welfare assessment of transgenic mice. *Lab Anim* 2001;**35**:379–89
- 24 Tos P, Ronchi G, Nicolino S, et al. Employment of the mouse median nerve model for the experimental assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Methods* 2008;**169**:119–27
- 25 Luszczki JJ, Czernecki R, Wojtal K, Borowicz KK, Czuczwar SJ. Agmatine enhances the anticonvulsant action of phenobarbital and valproate in the mouse maximal electroshock seizure model. *J Neural Transm* 2008;**115**:1485–94
- 26 Sternberg WF, Scorr L, Smith LD, Ridgway CG, Stout M. Long-term effects of neonatal surgery on adulthood pain behaviour. *Pain* 2005;**113**:347–53
- 27 Crockett RS, Borschein RL, Smith RP. Diurnal variation in response to thermal stimulation: mouse-hotplate test. *Physiol Behav* 1977;**18**:193–6
- 28 Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histochemistry*. 2nd edn. Columbus, OH: Battelle Memorial Institute, 1987
- 29 Thompson SW, Thomas CC. *Selected Histochemical and Histopathological Methods*. Springfield, IL 1966
- 30 McLeod MJ. Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology* 1980;**22**:299–301
- 31 Hankenson FC, Garzel LM, Fischer DD, Nolan B, Hankenson KD. Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (*Mus musculus*): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioural responses. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008;**47**:10–18
- 32 Zhuo M. NMDA receptor-dependent long term hyperalgesia after tail amputation in mice. *Eur J Pharmacol* 1998;**349**:211–20
- 33 Sternberg WF, Smith L, Scorr L. Nociception and antinociception during the first week of life in mice: sex differences and test dependence. *J Pain* 2004;**5**:420–6
- 34 Fitzgerald M, Jennings E. The postnatal development of spinal sensory processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:7719–22
- 35 Fitzgerald M, Beggs S. The neurobiology of pain: developmental aspects. *Neuroscientist* 2001;**7**:246–57
- 36 Pieretti S, d'Amore A, Loizzo A. Long-term changes induced by developmental handling on pain threshold: effects of morphine and naloxone. *Behav Neurosci* 1991;**105**:215–18
- 37 d'Amore A, Pieretti S, Chiarotti F, Loizzo A. Chronic treatment with MIF-1 prevents the painful stimuli threshold elevation induced by neonatal handling in mice. *Peptides* 1991;**12**:1291–4