

Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio

PRIMER INFORME DEL GRUPO CONJUNTO DE TRABAJO BVA/FRAME/RSPCA/UFAW SOBRE *EL REFINAMIENTO*

Artículo original en Inglés publicado en *Laboratory Animals* (1993) 27, 1-22.

Contenido	Páginas	Contenido	Páginas
Prólogo		9. Guía del límite de severidad ligada a la solicitud de autorización de proyecto.....	
1. Objetivo del informe	2	10. Formación	
2. Introducción		11. Resumen de las normas de buenas prácticas.....	
3. Acceso venoso		Glosario de términos	
4. Cánulas venosas y canulación		Apéndice A: Sangrado retro-orbital	
5. Recogida de sangre de las arterias		Referencias	
6. Punción cardíaca	16	Otras publicaciones e información	
7. Volumen de sangre a extraer		Tablas	
8. Efectos de la anestesia y de los sedantes sobre los recuentos sanguíneos			

Los miembros del Grupo Conjunto de Trabajo sobre el Refinamiento son:

D B Morton, D Abbot, R Barclay, B S Close, R Ewbank, D Gask, M Heath, S Mattic, T Poole, J Seamer, J Southee, A Thompson, B Trussel, C West and M Jennings.

British Veterinary Association (BVA), Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME), Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA) and Universities Federation for Animal Welfare (UFAW).

Prólogo

Siempre que se utilicen animales en los laboratorios, habremos de considerar que un objetivo, tan importante como el de obtener resultados experimentales, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que éstos puedan sufrir. El *Refinamiento* de los procedimientos para conseguir que sean más humanos debe ser parte integrante de toda investigación científica. Esto es importante, tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria, como para cumplir con los requisitos de la Legislación sobre Animales de Investigación.

En los últimos años, se ha puesto más atención en la necesidad de reconocer y controlar los efectos negativos de los procedimientos científicos sobre los animales. De la misma manera, se ha prestado atención a la necesidad de mejorar y enriquecer el medio ambiente en el cual los Animales de Laboratorio pasan su vida. Hay por lo tanto un gran ámbito para mejorar la práctica habitual de laboratorio en beneficio del bienestar animal. Dichas mejoras, pueden también favorecer la calidad de la investigación científica, ya que el sufrimiento y el miedo en los animales puede traducirse en cambios fisiológicos que son susceptibles de añadir otra variable a los resultados experimentales.

Las mejoras significativas de las técnicas de laboratorio y cría de ganado pueden introducirse inmediatamente de diferentes maneras. Para ello, una información clara, inequívoca y actualizada sobre todos los aspectos del cuidado y uso de los Animales de Laboratorio debe estar preparada y disponible. La preocupación sobre la necesidad de proporcionar tal información llevó al RSPCA, FRAME, UFAW y al BVA a establecer un Grupo Conjunto de Trabajo en 1989. El objetivo del grupo era el de establecer una serie de talleres para discutir las formas en las que los procedimientos comunes de laboratorio podrían ser refinados para minimizar el dolor o el miedo causado a los Animales de Laboratorio. Los miembros de cada parte componente del grupo de trabajo, fueron escogidos entre la comunidad científica, la industria, los entes académicos y las organizaciones para el bienestar animal. Un observador de la Inspección del Ministerio del Interior estuvo presente en el Grupo de Trabajo.

Cada taller se propuso desarrollar un solo tema, siendo las actas publicadas en la prensa científica. Este informe, titulado *ALa Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio* es el primero de la serie. Tiene por objeto describir en detalle los métodos más humanos para sacar muestras de sangre de las especies comunes de Animales de Laboratorio. El segundo informe, sobre las mejoras de los sistemas de alojamiento para conejos está prácticamente terminado.

Algunos de los implicados en este taller son contrarios al uso de animales en experimentos que puedan causarles dolor, sufrimiento o malestar. Sin embargo, comparten con muchos otros en la ciencia, el objetivo común de reducir el sufrimiento animal allá donde ocurra. Los informes de estos talleres sobre el refinamiento tienden a ayudar a cumplir con este objetivo, especialmente si se leen conjuntamente con otros informes recientes sobre el reconocimiento, medición y alivio del dolor o malestar en los animales.

Es de esperar, que éste y los subsiguientes informes tengan amplia circulación en los establecimientos regidos por la Legislación sobre Animales y que las recomendaciones que contienen sean adoptadas como *ALa Mejor Práctica de Laboratorio*.

1 OBJETIVO DEL INFORME

Este informe es el primero de una serie sobre procedimientos científicos y cría de Animales de Laboratorio. Su objetivo es el de ayudar a las personas encargadas de extraer sangre de los animales para que puedan hacerlo de la forma más humana y eficiente posible, reduciendo al mínimo todo dolor, sufrimiento y trastorno que puedan sufrir los animales.

El informe también debería ser útil en los cursos de formación, o como lectura de base antes de solicitar una autorización personal o de proyecto bajo el Acta 1986 (Procedimientos Científicos) sobre Animales en UK. Se ha puesto especial énfasis en los detalles prácticos. Se espera que publicaciones como esta sobre el refinamiento de los procedimientos experimentales lleven a que *Ala mejor práctica se convierta en la práctica habitual*≡ en todos los laboratorios.

2 INTRODUCCIÓN

La sangre se extrae de los animales para una gran variedad de propósitos. Los científicos han de ser conscientes de que el proceso puede ser innecesariamente estresante para un animal, sencillamente por el trato, el tipo de anestesia o la incomodidad que se asocia a una determinada técnica. Los cambios fisiológicos asociados al incremento de tensión (estrés) pueden incluso invalidar los resultados (Ajika et al., 1972; O=Neil & Kaufmann, 1990; Sarlis, 1991). La comparación de sangre Anormal≡ obtenida con el método de cánulas alojadas permanentemente en animales en estado libre, con sangre obtenida por métodos más convencionales ha mostrado diferencias significativas, por ejemplo, en los niveles de prolactina, cortisol, corticosterona y glucosa, así como en el recuento de glóbulos rojos y blancos, plaquetas y hematocrito. Puesto que el estrés puede causar reacciones fisiológicas susceptibles de afectar a la investigación, debería verificarse el método de muestreo de sangre utilizado en busca de cualquier cambio asociado, por ejemplo, a los niveles de corticosteroides en sangre. Entonces sería posible ver si un animal es capaz de adaptarse a un procedimiento y en consecuencia está menos estresado. **Obviamente, el estrés debe reducirse al mínimo, en pro de una buena ciencia y la mejora del bienestar animal.**

Merece la pena destacar, que al recoger sangre para la producción de anticuerpos, sería deseable recoger la sangre con un anticoagulante y procesar el plasma. La producción de suero sanguíneo es relativamente pobre y la producción de anticuerpos del plasma puede ser de 20-50% superior a la del suero.

El informe está dividido en capítulos que describen la extracción de sangre de las venas (Capítulo 3 y 4), de las arterias (Capítulo 5), y por punción cardiaca (Capítulo 6). Se da una información más amplia cuando la vía para la extracción de sangre puede ser utilizada también para la administración de sustancias o para medir la presión sanguínea. Cada capítulo se subdivide para describir las posibles técnicas y sus ventajas e inconvenientes. Los efectos adversos potenciales de cada una de ellas se discuten junto con las recomendaciones sobre como minimizarlos. El informe concluye, con una guía de limitaciones a la severidad de las técnicas de muestreo de sangre en las solicitudes de autorización de proyectos, junto con las recomendaciones para la formación del personal autorizado.

3 ACCESO VENOSO

3.1 Introducción

El volumen de sangre extraído de un animal, normalmente será determinado por el protocolo que a su vez, dependerá de aspectos tales como la sensibilidad de las pruebas que se utilizarán posteriormente. El capítulo 3.2. trata de la extracción de pequeños volúmenes de sangre de menos de 0.1 ml. De los volúmenes de más de 0.1 ml se trata en el capítulo 3.3. Los métodos de punción venosa que presentan un interés y preocupación especial están descritos en el capítulo 3.4.

Es importante que las técnicas científicas sean refinadas constantemente para que sólo se necesiten pequeños volúmenes de muestra de sangre. No obstante, aún puede haber ocasiones en las que el pequeño tamaño del animal sea crítico debido al volumen o frecuencia de las muestras de sangre requeridas (por ejemplo los ratones). En tales casos, no se debería arriesgar el bienestar del animal ni tampoco utilizar más animales, o bien considerar alguna forma de transfusión de sangre compensatoria o de reposición apropiada. El muestreo frecuente incrementa el estrés en el animal y si es necesario, el científico deberá considerar la posibilidad de canulación. Incluso a corto plazo, esta técnica es una alternativa preferible a la punción venosa repetida. Se trata como tema separado en el Capítulo 4.

3.2 Volúmenes del orden de 0.1 ml (ver Cuadro 1)

Se puede pinchar una vena superficial para obtener sangre destinada a realizar valoraciones hematológicas o químicas que requieran solamente 50-200 Φ l (aproximadamente equivalente a 1-4 gotas). Normalmente no se necesita anestesia ya que el estrés asociado sería probablemente mayor que la incomodidad de un pinchazo de aguja o de una punción con un pequeño objeto esterilizado puntiagudo.

3.2.1 Equipamiento

Hay que utilizar una aguja o lanceta esterilizada para pinchar la piel y el vaso sanguíneo subyacente. No es recomendable utilizar una hoja de escalpelo (bisturí) ya que su uso es impreciso y puede ocasionar una mutilación accidental del animal o de la persona, si el animal no está adecuadamente sujeto.

3.2.2 Lugar

Los lugares recomendados para la punción venosa para diferentes especies se muestran en el Cuadro 1.

Para familiarizarse con la ubicación de una vena, se recomienda encarecidamente estudiar primero la anatomía correspondiente en los animales muertos, para evitar tener que realizar repetidas

entradas fallidas a la hora de encontrar un vaso sanguíneo.

Un lugar habitual para practicar la punción venosa en un animal pequeño es la vena coccígea o de la cola. En pequeños roedores, la extremidad de la cola puede ser amputada y en el caso de los ratones- a diferencia de las ratas- no parece implicar la eliminación de ninguna vértebra coccígea. El corte de la cola tiene que realizarse una sola vez o dos como máximo. (En ratas topo desnudas se puede hacer pequeñas extirpaciones al final de la cola, que vuelve a crecer en 4-6 semanas y entonces puede realizarse de nuevo.)

En pequeños animales sin cola, como los cobayas y hámsteres, se puede utilizar la vena yugular o la de la oreja, pero requiere gran habilidad; en estos mamíferos, la punción cardíaca con anestesia general puede ser el método más adecuado. En animales grandes es más probable que una pequeña muestra se tome directamente de una vena superficial (Ver Capítulo 3.3). En las aves, puede practicarse la punción en las barbas, crestas y moco, en el caso del pavo.

La utilización de las almohadillas plantares para la obtención de sangre no es aceptable debido a la sensibilidad de la zona y el riesgo de infección, ya que los Animales de Laboratorio habitualmente se guardan cerca, o en lechos contaminados por orina y heces. La infección puede causar cojera y sufrimiento innecesario.

3.2.3 Preparación del lugar.

Es importante mantener una antisepsia completa a lo largo del muestreo, de forma que todo pelo o resto de piel superficial de encima de la vena, sea retirado. El método para eliminar el pelo dependerá de la localización de la vena y de la especie animal. El pelo se puede eliminar a tirones, con tijeras curvas o con esquiladora. Retirar el pelo a tirones puede realizarse fácilmente en los gatos y conejos sin causar sufrimiento al animal. Las cremas depilatorias químicas pueden aplicarse en zonas difíciles pero generalmente no se recomiendan ya que pueden provocar reacciones en la piel y contaminar las muestras. [N.A. Algunos animales tales como los gatos, pueden incomodarse con el ruido producido por las esquiladoras eléctricas. Hay que tener en cuenta también, que las pieles de algunos animales, por ejemplo la de los conejos, son finas y sensibles.] No es recomendable afeitar con cuchilla, jabón y agua ya que causa más daño a la piel que el esquilar. Las excepciones dependerán de la experiencia del operador, de la soltura a la hora de esquilar y el efecto que pueda causar en los animales y de la calidad de la muestra requerida.

La zona rasurada o de la que se ha retirado el pelo a tirones deberá ser limpiada con agua templada, a la que se le puede añadir un detergente o desinfectante como la cetrimida. Estos agentes deberán ser posteriormente retirados con agua para evitar la contaminación de la muestra. El alcohol (etanol 70% en agua) desengrasará efectivamente la piel de aquellas especies en las cuales la secreción de glándulas sebáceas sea pronunciada (por ejemplo en las ovejas), pero puede contaminar una muestra de sangre si no se le deja evaporar. Es casi imposible producir una superficie Aestéril≅ y una limpieza excesiva trastornaría el ecosistema bacteriano natural de defensa de la piel. La preparación puede tener entonces el efecto posterior de causar irritación, deshidratación de la piel e incomodidad del animal.

Para disminuir toda molestia asociada a la punción venosa, algunos científicos han investigado recientemente el uso de cremas de anestesia local aplicadas sobre la piel unos 30-60 minutos antes de tomar la muestra. Parecen ser beneficiosas en la reducción de las molestias en especies como

conejos, perros y gatos pero no son tan efectivas en ratas (Flecknell *et al.*, 1990).

3.2.4 *La toma de muestra*

El animal debe estar suavemente sujeto por un manipulador experimentado que, siempre que sea posible, deberá ser conocido por los animales. **No hay tampoco que sobrevalorar el papel clave desempeñado por la persona que sujeta al animal y evidencia la vena.**

La vena debe localizarse claramente (si se tienen dudas, es mejor no hacerlo y buscar ayuda) y la punción llevada a cabo decididamente mejor que con vacilaciones. Puede que el animal muestre signos de incomodidad (¡como nosotros!) por ejemplo, puede chillar, pero se le debe tranquilizar, tratándole con suavidad y Ahablándole. Puede que se necesite alguna presión próxima al lugar de oclusión del retorno venoso con el fin de obtener suficiente volumen de sangre. La gota de sangre formada puede retirarse con un tubo capilar o con una micropipeta con punta de plástico. Después de haber sacado la sangre, se debe mantener una presión suave pero firme sobre el lugar durante unos 30 segundos, lo que detendrá rápidamente cualquier sangrado. También hay varios preparados hemostáticos de alginato de calcio, fibrillas de colágeno y esponja gelatinosa que pueden servir de ayuda si persiste el sangrado.

3.2.5 *Posibles efectos adversos*

Existen cuatro efectos adversos: hemorragias, hematomas, trombosis y estrés causados por una manipulación inadecuada. El tratamiento adecuado depende del lugar, de la causa y del animal en particular. **Se debe buscar consejo sobre el tratamiento, por ejemplo, del Veterinario Titular o de un licenciado experimentado.**

La hemorragia debida a una hemostasia pobre, no es un problema habitual, a menos que el animal tenga un defecto de coagulación y en algunos casos, una presión suave continua durante unos minutos, puede ser todo lo que se necesite para parar el sangrado.

Los Ahematomas se deben al sangrado subcutáneo en el momento de la punción venosa o son provocados por el propio animal al lamerse o rascarse una vez devuelto a su jaula o corral. Se debe controlar al animal después de unos 30 minutos y si es necesario, tomar las medidas adecuadas (consultar al Veterinario Titular).

La trombosis (coágulo) y la flebitis (inflamación de la vena), se producen habitualmente por técnicas incorrectas o restos de una sustancia irritante (por ejemplo productos químicos basados en alcohol) alrededor de la vena. Ocasionalmente pueden ocurrir a consecuencia una auto-mutilación.

El nivel correcto de sujeción, es el que permite tomar una muestra satisfactoria al primer intento sin causar pánico innecesario en el animal, en cuyo caso, otros animales próximos pueden alarmarse, lo que llevaría a complicaciones tanto científicas (por ejemplo, elevación de la glucosa en sangre, presión sanguínea) como de bienestar (Ver sección 3.2.6.).

3.2.6 *Problemas científicos*

Incluyen la contaminación de la muestra con bacterias de la piel, secreciones y detritus (a través de una preparación inadecuada de la zona) o por componentes de tejidos subcutáneos. La importancia de estos contaminantes dependerá del propósito de la recogida de sangre. La contaminación de los

fluidos de los tejidos se verá agravada por el estrujamiento de los tejidos para obtener una gota de sangre así como por los múltiples pinchazos con las agujas. Por lo tanto, ambas actuaciones han de evitarse.

Si se produce un sangrado persistente en un animal o en una colonia de animales, entonces se puede pensar en un posible defecto de coagulación (por ejemplo deficiencia del Factor VII en perros beagles y de la vitamina K en roedores).

Utilizar demasiada fuerza en sujetar al animal puede provocarle estrés y elevar sus niveles de catecolaminas y glucocorticoides en sangre. Esto a su vez alterará parámetros sanguíneos como el hematocrito y el nivel de glucosa en sangre.

3.3 Volúmenes mayores de 0.1 ml (Ver Cuadro 1 y Capítulo 6)

El volumen de sangre extraída y la frecuencia de los muestreos se basarán en el propósito del procedimiento científico y el volumen total de sangre del animal (Ver Capítulo 7 para volúmenes máximos). Se debe considerar seriamente el efecto combinado del tamaño de la muestra y de la frecuencia de la extracción de sangre. Los muestreos múltiples pueden llevarse a cabo por punciones repetidas con aguja pero existen alternativas mejores como la de utilizar una aguja de mariposa o una cánula percutánea (sobre la aguja) fijada con adhesivo en la posición adecuada (ver Capítulo 4.1).

3.3.1 Equipamiento y sujeción

Habitualmente en los animales grandes la punción venosa se realiza sujetando físicamente al animal y no es necesaria anestesia. A los animales pequeños se les da a menudo un anestésico de acción corta para manipularles con comodidad. Sin embargo, se debe recordar que tales agentes pueden afectar los parámetros hematológicos y bioquímicos (Ver Capítulo 8). A algunos animales tales como los perros y algunos primates, se les puede entrenar para que presenten una extremidad para toma de muestra sin recurrir a la anestesia o sujeción física. Es importante realizar una manipulación suave pero firme, así como también es importante el tiempo empleado en extraer la muestra. Ambos parámetros pueden afectar al estrés del animal y por consiguiente la calidad de la muestra y la exactitud de la investigación. Se podría considerar la posibilidad de ofrecer una recompensa después de cada sangrado, según las especies. (Los Métodos de sujeción de animales para llevar a cabo procedimientos menores serán el tema de otro taller sobre refinamiento dentro de esta serie).

Tamaño de la aguja. El tamaño de la aguja- la longitud y el calibre es muy importante. Una aguja que sea demasiado larga es difícil de manejar y puede dar lugar a la coagulación de la sangre en la aguja y laceración de la vena. Por otro lado, un gran calibre, en tanto minimiza la coagulación (y también la hemólisis sanguínea) tiende a dañar la vena y puede predisponer a la formación de hematomas. Es interesante hacer notar que agujas de gran calibre (20 G) no afectan más, en ratones y ratas, que cualquier aguja de calibre más pequeño (25G), esto podría ser debido a la menor duración de la manipulación y una extracción de sangre más rápida asociada con las agujas mayores (Ver

Barclay *et al.*, 1988).

Nuestra recomendación es utilizar el mayor calibre posible para asegurar una extracción de sangre rápida sin colapsar la vena, dentro de la limitación de evitar hematomas, por ejemplo el calibre deberá ser justo menor que el diámetro de la vena.

Es posible extraer sangre de la mayoría de las especies con una variedad de agujas de entre 10-50 mm de longitud y entre 15-27 G de calibre. Así, la extracción de sangre de la vena yugular de grandes mamíferos, por ejemplo animales de granja, perros, gatos y algunos primates podría llevarse a cabo con una variedad de agujas de entre 14-20 G x 25-40 mm. Para la extracción de sangre de la vena del rabo de una rata o vena de la oreja en el conejo una aguja del orden de 23-26G x 10-20 mm podría ser la más apropiada. Cuando se muestrea repetidamente se debe utilizar una aguja nueva cada vez. La dirección de la aguja es habitualmente la del flujo sanguíneo. Esto puede variar según la accesibilidad del lugar.

3.3.2 Lugar y localización de la vena

Los lugares para la punción venosa en diferentes especies se dan en el Cuadro 1.

Es importante localizar la vena con exactitud antes de tomar la muestra. La obstrucción del retorno venoso- normalmente por encima del lugar de la punción cuando ésta sea caudal (extremo de la cola) al corazón, y por debajo del lugar de punción cuando sea craneal (final- cabeza) puede ser necesaria para distender la vena y evitar el movimiento excesivo de la misma. Esto hace que la localización y la introducción de una aguja (o cánula) sea más sencilla.

La percusión puede ayudar a determinar el curso de una vena. La vena primero se obstruye con los dedos de una mano y el vaso se localiza con ligeros golpecitos con los dedos de la otra mano. Los dedos que bloquean la vena detectarán las percusiones y una línea imaginaria entre los dos delimitará el curso de la vena. (Esto es particularmente útil para la vena yugular).

Es importante que se dedique tiempo en hacer una localización exacta y una buena dilatación de la vena antes de pinchar el vaso. Observar a manipuladores experimentados ayudará a aprender esta técnica. En algunos animales, es frecuente que sea fácil ver la vena, particularmente si la piel no está pigmentada o si la vena es grande. Esquilar o rebajar el pelaje con un agente humidificante (alcohol 70%, o agua con detergente) también puede ayudar.

Otro punto importante a considerar es el hecho de que el grosor de la piel varía ampliamente entre las especies, así como entre las zonas en el mismo animal. (Las superficies de piel lateral y dorsal tienden a ser más gruesas que la ventral o medial). Además, las tomas repetidas de muestra pueden llevar a la fibrosis de la vena y engrosamiento de la piel.

Dilatación de la vena. **La dilatación de la vena (p.e. por obstrucción suave o por calentamiento) facilitará el muestreo de sangre.**

En animales anestesiados, la vasodilatación puede ocurrir como consecuencia del anestésico. Los animales anestesiados pueden no necesitar calentamiento y por lo tanto, conviene tener en cuenta

esta posibilidad de sangrado bajo anestesia. En animales conscientes, sin embargo, la sangre se puede obtener más fácilmente si el animal es calentado primero. Los animales pueden ser colocados en una caja termoestática, previamente calentada termoestáticamente (por ejemplo hecha de material plástico) a 30°C durante 10-15 min. Es fundamental que estén bajo constante observación para prevenir la hipertermia (indicada por una respiración acelerada, jadeo o salivación). El tamaño de la caja dependerá de las especies y del número de animales. Si se utiliza una bombilla a modo de fuente de calor, se debe tener cuidado para evitar que se produzcan quemaduras en las orejas o cegar a los animales. Las ratas y los ratones utilizan sus colas para ayudar en la termorregulación y, otra práctica común es, por lo tanto, introducir la cola de estos roedores en agua templada (una temperatura medida alrededor de los 45° C es adecuada) antes de sacar sangre. Aunque no es tan efectivo como un calentamiento general del cuerpo, en ratas viejas tiene el efecto de suavizar la piel de la cola haciendo el paso de la aguja más fácil e incrementando así la precisión.

La utilización de xileno (xilol, dimetilbenceno) para dilatar la vena no está recomendada, ya que provoca con frecuencia erupciones cutáneas y se tiende a abusar de él. Se puede obtener el mismo efecto calentando el animal como se ha descrito arriba. El efecto del xileno es el de un irritante, que hace que los vasos sanguíneos se dilaten. Si se utiliza regularmente y no se retira adecuadamente puede ocasionar daños en los tejidos incluyendo el engrosamiento, e incluso la formación de costra (por ejemplo en parte de la oreja de los conejos).

Merece la pena destacar que algunos agentes químicos utilizados para sedar o anestesiarse al animal (por ejemplo, fentanil/fluorano (Hypnorm=), acetilpromazina en conejos) puede provocar la vasodilatación periférica así como tener efecto sobre los parámetros hemáticos y bioquímicos (ver Capítulo 8).

3.3.3 *Preparación de la zona* *Ver Capítulo 3.2.3*

3.3.4 *Toma de la muestra*

Habiendo localizado y averiguado el recorrido de la vena, y habiéndola dilatado e inmovilizado, el siguiente paso es el de perforar la piel con la aguja B a veces junto con una jeringuilla. Apuntar para perforar la piel y la vena de un solo movimiento dirigiendo la punta de la aguja (el bisel hacia arriba) un poco más arriba de la vena, de manera que el ángulo de penetración sea casi paralelo a la vena. (El ángulo de penetración no debe ser excesivo ya que cuanto mayor sea el ángulo de entrada de la aguja más probable es que se atraviese la vena). En animales pequeños o nerviosos puede ser preferible introducir primero la aguja y después acoplar la jeringuilla. Puede ser incluso mejor utilizar agujas de mariposa con un tubo flexible incorporado.

Merece la pena recordar que **una vena se colapsará si la muestra se toma demasiado deprisa, y por lo tanto, hay que tener cuidado para asegurar que se toma a un ritmo adecuado.** La manipulación suave (por ejemplo torsión, presión suave), puede incrementar el flujo sanguíneo pero si es demasiado vigorosa afectará a la calidad de la sangre recogida.

Se pueden utilizar vacutainers¹, de uso muy frecuente en especies grandes. Deben considerarse los volúmenes correctos, tamaños y niveles de flujo venoso. La hemólisis de la muestra puede resultar un problema (por ejemplo, el suero coloreado o plasma resultante de la hemólisis de las células rojas sanguíneas puede interferir en los análisis cromáticos como el ELISA). Sin embargo, esta hemólisis depende de las especies, del tamaño y la fragilidad de las células sanguíneas rojas y de la fuerza de vacío aplicada. La hemólisis puede ser minimizada permitiendo que la sangre fluya a través de la aguja, más que aplicando una presión negativa.

Retirada de la aguja. Una vez retirada la aguja (o cánula) se debe aplicar una presión continua, inmediatamente después, en el lugar de la punción durante al menos 30-60 segundos.

Se debe entonces observar la zona unos 30 segundos más, para asegurarse que no se vuelve a producir sangrado. El animal puede ser devuelto a su jaula y controlado de nuevo después de 10-15 minutos. Si hubiera alguna probabilidad de que el sangrado se reprodujera, deberá aislarse el animal enseguida para que pueda estar controlado muy de cerca. Eso también impedirá daños canibales por parte de otros animales. También habrá que tener cuidado en el manejo de los animales después de la extracción de sangre, ya que una mala manipulación puede estimular el sangrado debido a traumas físicos y/o elevar la presión sanguínea. La utilización de cauterización térmica y selladores artificiales de piel para la hemostasia no es recomendable, como tampoco lo son los lápices cáusticos y otros astringentes, ya que pueden provocar molestias. **Si el sangrado no puede ser detenido por preparados hemostáticos, se deberá llamar a un Veterinario.**

3.3.5 Posibles efectos adversos

Algunos de los problemas que pueden surgir después de la punción venosa, se han mencionado más arriba (3.2.5), por ejemplo hemorragias, hematomas, trombosis y el estrés provocado por una manipulación inadecuada. Otros problemas incluyen la infección del lugar de entrada de la aguja que puede después extenderse sistemáticamente. El sangrado repetido, puede producir flebitis y cicatrices que también pueden ocurrir, a consecuencia de intentos repetidos de punción venosa. La probabilidad de que esto ocurra, puede reducirse mejorando la técnica (utilizando cánulas introducidas permanentemente) y alternando las zonas de muestra. Una recomendación es la de empezar el muestreo en un extremo de la vena, normalmente empezando con el extremo más alejado del corazón. Los hematomas que aparecen serán gradualmente reabsorbidos pero, entretanto, proporcionan un foco temporal de infección y pueden causar inapetencia y una elevación de la temperatura corporal.

También es posible dañar a los nervios que acompañan la vena cuando una aguja se desvía, por ejemplo, al tomar muestra de las venas femoral y yugular. La oclusión venosa puede ser el resultado de la trombo-flebitis y esto puede ocurrir después de que se haya administrado una sustancia de forma perivascular en vez de forma intravenosa. Más raras son las embolias debidas a la liberación de un trombo con una aguja o como resultado de la inyección accidental de una pequeña cantidad de aire. Normalmente, esto no parece tener mucho efecto en el animal, aunque dichas embolias

¹ Recogida de sangre en frascos al vacío acoplados a un adaptador especial de agujas.

potencialmente pueden causar la muerte.

3.3.6 *Problemas científicos*

En algunas especies la sangre se coagula muy rápidamente cuando se saca en una jeringuilla. Este problema puede superarse al llevar la sangre directamente a una solución anticoagulante tal como heparina o citrato.

La jeringuilla deberá estar cargada con el volumen necesario de anticoagulante para un volumen de sangre final dado. La heparina deberá utilizarse a una concentración final de 5-25 IU/ml. El citrato se utiliza habitualmente a una concentración de una parte de citrato de sodio 3.8%, más tres partes de sangre pero, debemos ser conscientes del efecto de la dilución. (N.A. La sangre tiende a coagular más rápidamente en jeringuillas de vidrio que de plástico).

El hecho de cortar con tijeras la extremidad de la cola de las ratas y ratones y A ordeñarla≅ puede provocar la hemólisis de la sangre y la contaminación con fluidos de otros tejidos. Otras causas de hemólisis son la recogida con aguja demasiado fina, la aplicación de un vacío excesivo y la mezcla demasiado vigorosa de la muestra con el anticoagulante en el tubo o jeringuilla.

Como se describió para la recogida de una pequeña cantidad de sangre, la sujeción excesiva o cualquier otra forma de estrés para el animal llevará a la liberación de varias hormonas con los efectos colaterales descritos en el Capítulo 3.2.6.

3.4 **Métodos de punción venosa no recomendados y que requieren una particular justificación.**

Muchos métodos tradicionales de muestreo de sangre, no pueden aceptarse hoy en día debido a su crudeza y porque existen ahora métodos que causan menos dolor al animal y proporcionan una muestra de sangre más aceptable. Hoy día, es posible obtener agujas y cánulas del tamaño correcto para prácticamente todas las especies, de tal manera que no es necesario tener que recurrir a la laceración de una vena a lo largo de su recorrido. Los métodos que impliquen cortar las venas de la oreja, hacer cortes en la cola repetidamente (o la vena de la cola de cualquier animal) y cortar u| as o garras en carne viva, deben por lo tanto evitarse. En ratas, los cortes repetidos de la cola pueden llevar a producir granulomas, lo que da lugar a la formación de una gran masa de tejido en la extremidad de la cola. Si las muestras se recogen regularmente a intervalos cortos (por ejemplo una vez a la semana) el granuloma no tiene tiempo de desarrollarse. Las amputaciones repetidas de la cola en cualquier especie, pero particularmente en ratas, pueden eliminar la capacidad natural del animal para controlar su temperatura corporal y equilibrio y causar granulomas. Esta práctica es, por lo tanto, inaceptable como método de muestreo repetido. No obstante, hay ocasiones en las que, para una sola muestra, el cortar con tijeras la extremidad de la cola puede, sin embargo, ser el método menos invasivo.

Cortar a través de la vena metatarsal por encima de la articulación del jarrete (esta vena a menudo es demasiado difícil, demasiado móvil y estrecha para utilizar una aguja) no es aconsejable debido a los problemas para detener el sangrado, los daños a las estructuras asociadas y la gran probabilidad

de infección - como ocurre con la almohadilla plantar.

No se recomienda utilizar la vena púbica o del pene o la de la lengua ya que esto acarrea un potencial considerable de efectos adversos, por ejemplo, si se produce trombosis puede llevar a un bloqueo temporal de la uretra o hinchazón de la lengua y causará sin ninguna duda una extrema molestia y más que probable intenso dolor.

3.4.1 *Sangrado del seno venoso orbital*

Esta técnica implica pinchar el seno venoso detrás del globo del ojo y se conoce de diferentes maneras como retro-orbital, peri-orbital, orbital posterior y sangrado del plexo venoso orbital. En manos expertas, el sangrado del seno venoso orbital puede ser un método útil para obtener buenas muestras de animales sin cola, como el hámster, o de ratones en los que se requieren volúmenes mayores de los que se pueden recoger de la vena de la cola. Sin embargo, es una técnica que puede tener severas consecuencias para el animal y por lo tanto, **no recomendamos el uso del sangrado retro-orbital con recuperación del animal** mas que en circunstancias excepcionales cuando no haya ningún otro método disponible. Siempre debe realizarse bajo anestesia y debe utilizarse una sola órbita. Puesto que la técnica acarrea un potencial considerable de daño inadvertido y efectos adversos consecuentes, solo debe ser ejecutada por personas competentes. **Esta técnica no es aceptable más que como procedimiento terminal bajo anestesia.** También debe advertirse que algunas personas encuentran este procedimiento desagradable y por lo tanto no debe pedírseles que lo realicen.

4 CANULAS VENOSAS Y CANULACIÓN (Ver Cuadro 2)

4.1 Introducción

La canulación es una técnica importante para la extracción de sangre porque reduce el estrés del muestreo multiple asociada con, por ejemplo, la sujeción y las molestias de los pinchazos repetidos de aguja.

Las cánulas pueden implantarse (canulación) y ser utilizadas en lugar de entradas repetidas de aguja en una única zona, o sustituyendo a muestreos simples en varias zonas en un periodo relativamente corto de tiempo. Si se requiere un muestreo de unas cuantas horas de duración, se puede utilizar una cánula temporal tal como una aguja de mariposa o una cánula de plástico mantenida con cinta adhesiva o algún tipo de vendaje. La canulación de larga duración es muy conveniente para los muestreos múltiples de corta duración repetidos.

Con esta técnica se pueden producir algunos problemas que debe ser tratados. Cualquiera que sea el método, la habilidad quirúrgica es fundamental para colocar y fijar la cánula (ver Gellai & Valtin, 1979; Desjardin, 1986; Dennis *et al.*, 1986; Van Dongen *et al.*, 1990). Tanto en las canulaciones de larga o corta duración, será necesario sujetar al animal de alguna manera para impedirle retirar la cánula, pero la forma dependerá mucho de la especie. No siempre es posible dejar los animales en

completa libertad ya que pueden morder la cánula. Muchas de las especies más grandes parecen adaptarse bien a una canulación de larga y corta duración, particularmente después de un periodo de entrenamiento (aclimatación) a la sujeción y algunos pueden ser alojados en grupos con vendajes adecuados y protección para la cánula. Por otro lado, a los mamíferos más pequeños, como las ratas, a menudo se les sujeta con algún tipo de arnés, anilla giratoria (swivel) y atadura a lo largo del cual va la cánula. (A veces a esta disposición se le suele referir como un ombligo- ver Capítulo 4.9). Pero incluso los animales pequeños deben ser acondicionados (aclimatados) al arnés antes de la canulación y aún así la situación de estrés puede aparecer. Las cánulas pueden mantenerse en perros, cerdos, ratas y conejos sin utilizar arneses ni vendajes fijos.

Cuando se está tratando con animales sociables, se debe procurar mantenerlos preferiblemente en grupos, mejor que por separado. Los cerdos, gatos y titís han sido alojados en grupo con éxito con la cánula instalada. Los primates generalmente tienden a jugar con los arneses y destruirlos y tanto los primates como los perros, tienen tendencia a masticar el aparato puesto en otros animales de la misma jaula. Por lo tanto, puede que tengan que ser mantenidos separados. Una alternativa que permite la separación, pero preserva el contacto social, es tener mallas en lugar de separadores opacos entre las jaulas o corrales, aunque los animales puedan a veces enganchar sus cánulas en la red si no están bien protegidas.

El investigador tiene que considerar cuidadosamente el equilibrio entre los posibles efectos adversos y los beneficios del sistema de muestreos múltiples de sangre o el de canulación. La técnica elegida dependerá sin duda del dominio que se tenga y de la frecuencia y volumen de muestras requerido.

Los métodos descritos en las secciones siguientes pueden causar gran molestia al animal y por lo tanto justifican la administración pre-operatoria de analgésicos y cuidados post-operatorios serios y el control durante todo el periodo de canulación.

4.2 Canulación de corta duración (normalmente menos de un día)

Esta técnica ha tenido éxito en la mayoría de las especies excepto en los ratones.

Utilizando precauciones asépticas, se puede insertar en la vena y dejar in situ una aguja de mariposa². Es preferible utilizar un dispositivo similar, pero sustituyendo la aguja por una cánula de plástico. Esta no tiene punta de metal que dañe la pared de la vena y así los movimientos de las extremidades del animal o del cuello no lleva a que la punta afilada de una aguja frote el lado de la pared del vaso. De este modo las laceraciones endoteliales, perforaciones y trombos son menos susceptibles de aparecer. Estas cánulas flexibles se insertan sobre una aguja en la vena, entonces la aguja, trocar o guía se retira y la cánula flexible es fijada con cinta o suturada *in situ*.

Se deberá dejar solución salina con heparina (por ejemplo 30 IU/ml) o algún otro anticoagulante en la cánula o aguja entre los muestreos. Un dispositivo de entrada múltiple en la punta de la cánula

² Una aguja acoplada a un trozo de tubo de politeno con dos aletas de plástico planas para tener una superficie donde poder fijarla con cinta adhesiva a la piel.

alojada es extremadamente útil ya que tiende a mantener en su lugar el anticoagulante y da acceso muy fácilmente para el muestreo con una sujeción mínima del animal. Las agujas con punta de Huber prolongan la vida de estas aberturas ya que tienden a no destruir la membrana de silicona.

Una abertura canular más duradera puede lograrse en ratas con la canulación de la arteria femoral para la extracción de sangre, mejor que utilizando la vena yugular o la arteria carótida. No obstante, incluso utilizando la arteria femoral no se elimina el inconveniente de que la liberación de trombos pueda causar cojera de una o de ambas extremidades posteriores.

4.3 Canulación de larga duración (es decir, 2 días o más)

Uno de los mayores problemas con la canulación de larga duración es que los bloqueos debidos a trombos son más susceptibles de aparición. La destreza quirúrgica es esencial para colocar y fijar la cánula y debe llevarse a cabo asépticamente para lograr el mejor rendimiento. **Si el animal es joven, hay que dejar suficiente longitud de cánula para permitir el crecimiento.** (Esto es particularmente importante en los cerdos- son necesarios, al menos 24 cm para animales de entre 15 y 150 kg). **Para preservar las cánulas en estado de permanente apertura es importante dejar bucles de material de goma o plástico flexible que permitan el movimiento.**

4.4 Rendimiento de las cánulas

En animales pequeños es razonable esperar que las cánulas permanezcan abiertas al menos 2 o 3 días y algunos trabajadores logran mantenerlas abiertas durante 3 o 4 semanas o más. En animales más grandes es mucho más fácil mantener la función de las cánulas por periodos de varios meses- incluso años. Las infusiones continuas, por ejemplo, mediante minibombas sujetas con un vendaje y un cabezal lleno de líquido ayuda a mantener una cánula abierta pero sólo se puede aplicar con alguna forma de sujeción con atadura. Sin embargo, en general es mejor evitar periodos largos de sujeción y, con cualquier sistema, los animales deberán pasar por un periodo de entrenamiento antes del experimento para adaptarse a llevar un vendaje sin estar estresados innecesariamente. Los animales pueden entonces ser seleccionados para el experimento basándose en la tolerancia al vendaje o a la sujeción.

También es necesario, al considerar la canulación, distinguir entre infusión y administración de sustancias y la extracción de sangre. Es más fácil administrar compuestos que la extracción de sangre a largo plazo ya que los trombos adheridos a la extremidad de la cánula pueden actuar como una válvula de sentido único- permitiendo la infusión pero restringiendo la extracción.

4.5 Equipamiento y material

Habitualmente se utilizan cánulas de polipropileno, polietileno, nylon y goma pero la goma de silicona (silastic⁷) y las cánulas de Tygon⁷ parecen ser las más biocompatibles y se pueden obtener en una variedad suficiente de tamaños apropiados a todas las especies. Los materiales que no son de

silicona tienden a causar reacciones fibrosas mientras que las cánulas de silicona parecen causar menos reacciones, incluso después de 18 meses. El tubo de vinilo ya no se utiliza habitualmente.

El problema con la cánula de silicona es que es demasiado flexible y por lo tanto, predispuesta a retorcerse, especialmente las de tamaño pequeño. También es fácil que se obstruya el lumen al sobre-apretar las ligaduras de anclaje y hay que tener cuidado de comprobar que se encuentra abierto a la hora de la operación. Los tamaños grandes de cánulas de silicona en las que la relación entre el diámetro externo al interno es mayor de 2:1 habitualmente no causan problemas, pero diámetros internos de 1-2 mm pueden resultar difíciles de utilizar. En general, cuanto mayor es el diámetro interno de la cánula mejor funcionará y más fácil será de desbloquear, en caso de necesidad. Para evitar el problema de que una cánula pequeña se doble y se arrugue, se puede utilizar una cánula de polipropileno dentro de una cánula mayor de silicona o se puede recubrir una cánula de polipropileno con pintura de silicona. Así se tendrá el efecto de combinar la mayor rigidez del polipropileno con la biocompatibilidad de la silicona. Este tipo de cánula se dobla con menos facilidad, es más fácil de limpiar y también dará medidas de presión más reales que una de silicona sola.

4.6 Colocación de las cánulas

Existen dos mecanismos principales para asegurar una cánula. Primero, colocándola en el lumen de la vena y ligándola en el lugar a la vena misma. Segundo, la cánula puede insertarse en una vena aferente de la vena diana, con la punta en el lumen de la vena mayor. El primero de los métodos implica ligar una vena y eliminar su flujo, pero normalmente esto tiene poco efecto sobre el animal. Con una cánula yugular la punta puede dejarse muy cerca de la aurícula derecha en la vena cava craneal (anterior/superior) o caudal (posterior/inferior). Hay que tener cuidado de no colocarla dentro de la aurícula derecha ya que se podrían provocar arritmias cardíacas y producir la muerte por fibrilación auricular.

Cuando las cánulas tienen que ser introducidas distancias importantes, han de utilizarse técnicas de contraste radiográfico o de fluoroscopia para asegurarse que la colocación final de la cánula es correcta. Si no se dispone de técnicas radiográficas, **han de tomarse muy cuidadosamente medidas iniciales para asegurarse que se inserta la longitud correcta de cánula.** Cuando cualquier vena (por ejemplo, la parte distal de la vena principal o una aferente menor) está ligada, se producirá trombosis y por lo tanto la punta de la cánula debe estar colocada bien lejos del lugar de anclaje. La cánula puede colocarse a favor del sentido o a contrasentido del flujo sanguíneo, pero parece preferible colocarla a favor del sentido del flujo.

Deberán llevarse a cabo pruebas a la hora de colocar la cánula para asegurarse que la sangre puede ser extraída en la posición en la que se encontrará el animal cuando recobre la conciencia o cuando se desarrolle el experimento.

4.7 ASellando la cánula

La cánula puede terminarse en un punto de entrada múltiple, por ejemplo, un tapón de goma de

silicona que puede ir fijado a la extremidad de la cánula y que puede ser pinchado varias veces. Tiene la ventaja de que es de auto-sellado, y protegerá mejor la columna líquida dentro de la cánula frente a la contaminación microbiana. Dichos dispositivos de entradas múltiples, se encuentran a menudo en un gotero de solución salina o en el embolo sellador de una jeringuilla desechable de 1 ml y puede ser insertado en un cono Luer de una aguja que a su vez se inserta en la extremidad de la cánula. A continuación, el cono puede rellenarse con pegamento de silicona.

Cuando se utilice una aguja para extraer sangre, habrá que procurar penetrar solamente el tapón, en caso contrario la aguja podría pinchar el lateral de la cánula. Más seguro resulta utilizar agujas de Huber (con salidas laterales).

La extremidad de la cánula puede también ser lavada, asegurada y tapada con una espiga de plástico sólido o metal. Este sistema es adecuado siempre que se haga asépticamente. La desventaja de este método es que la sangre puede volver a entrar en la extremidad más baja de la cánula antes de que haya sido efectuado el sellado. Puede minimizarse la probabilidad de que esto ocurra apretando la cánula. Otra alternativa consiste en sellar la extremidad del tubo en caliente, asegurándose que corre algo de solución salina antes de sellar.

Se puede dejar un punto de entrada múltiple bajo la piel o dejar que sobresalga como un Abotón. Bajo un simple arnés, puede situarse una cánula con una espita, pero si se deja sobresalir demasiado lejos de la piel, es susceptible de ser agarrada o masticada por otro animal.

Siempre hay que tener cuidado de no introducir burbujas de aire en la circulación a la hora de limpiar. Aunque con pequeños volúmenes son probables pocos efectos adversos.

4.8 Dirigiendo la cánula hacia un lugar de salida.

La cánula puede ser llevada desde debajo de la piel a un lugar de salida, habitualmente en la parte posterior del cuello o entre los omóplatos (escápulas). Son posibles otros puntos de salida, pero los de encima de la espalda tienden a ser más seguros y protegidos de las interferencias del animal. A veces, una cánula yugular puede pasarse directamente entre los músculos a la parte posterior del cuello mejor que de forma subcutánea. Cualquiera que sea la vía elegida, hay que tener cuidado y asegurarse que la cánula no se dobla cuando el animal se mueve. Hay que tener cuidado también al seleccionar la longitud correcta de la cánula. Si es demasiado corta, la cánula puede retraerse, mientras que un exceso de tubo suplementario puede llevar a que se doble o se retuerza.

Hay varios métodos para fijar la cánula a la piel. La cánula simplemente puede salir a través de la piel y ser fijada con cinta o vendaje de alguna manera alrededor del cuello del animal, por ejemplo, con esparadrapo. Alternativamente, se puede dejar subcutánea con un punto de entrada múltiple o traerse a la superficie sujeta sobre algún tipo de bloque sólido de seguridad- se puede usar un soporte de metal o plástico especialmente diseñado para este fin.

Las cánulas también pueden ocultarse en el cuello mediante suturas superficiales de piel que sujeten la cánula en una cavidad entre 2 pliegues de la piel. Es importante recordar que las suturas o botones de sujeción pueden causar malestar. Esto se ha superado en ratas utilizando pequeñas pesas en la extremidad de la cánula lo que puede evitar la necesidad de suturar (ver Gellai & Valtin, 1979).

Cuanto más pequeño sea el lugar de salida, menos irritación provocará en el animal. Sin embargo, cualquier cosa que irrumpa a través de la integridad de la piel es una fuente potencial de

infección y por lo tanto este lugar debería ser observado y limpiado cuidadosa y regularmente y, si es necesario, tratado con un antiséptico suave (por ejemplo, Hibitane, Dermisol, polvos cicatrizantes para heridas) o el animal sometido a tratamiento con antibióticos bajo la dirección de un veterinario.

4.9 Sujeción

Los aparatos para sujeción constan de un muelle flexible unido a un anillo giratorio en un extremo (swivel) y al animal en el otro mediante un arnés (chaleco). El aparato es necesario para impedir que el animal (o sus compañeros de jaula) interfiera con la cánula. La sujeción indudablemente restringe los movimientos normales de los animales, tales como revolcarse y tumbarse de espaldas, y los animales atados, con frecuencia están alojados solos, añadiendo así más estrés y severidad al procedimiento (Brodie *et al.*, 1966).

4.10 Tomar una muestra manteniendo la cánula sin obstrucciones.

Al recoger sangre de una cánula, en primer lugar se debe retirar la mezcla anticoagulante (ver más abajo) que se encuentra en la cánula, extrayéndola con una jeringuilla, hasta que aparezca la sangre fresca. Extraer entonces la muestra de sangre. **Finalmente se rellena el Aespacio muerto de la cánula con una cantidad cuidadosamente calculada de anticoagulante fresco.** Esta ayudará a prevenir la trombosis.

Los anticoagulantes apropiados incluyen solución salina de heparina (10-1000 IU/ml) o citrato sódico (0.05% p/v) o cualquiera de estos en una solución densa como 25-50% de glucosa, 5-40% polivinil-pirrolidona. Otras soluciones densas incluyen dilatadores de plasma como AHemocé⁷ y mezclas con glicerol. También se pueden incluir antibióticos (ver Sección 4.12.3).

Para evitar la obstrucción de la cánula, ésta debe limpiarse con solución salina al menos dos veces a la semana, si no diariamente. Hay alguna polémica sobre la frecuencia de esta operación ya que algunos trabajadores mantienen que deben evitarse los lavados repetidos.

Deben seguirse precauciones asépticas estrictas para prevenir infecciones.

4.11 Extracción de la cánula al final del experimento

Las cánulas deben retirarse cuando ya no se necesitan para evitar prolongar el malestar del animal y la formación de trombos e infecciones. Si el animal ha de utilizarse de nuevo después de la canulación, o tiene que ser re-canulado, la antigua cánula ha de ser retirada y la vena desligada.

4.12 Efectos adversos potenciales.

4.12.1 Bloqueos

El mayor problema en canulación no es la colocación de la cánula sino su posterior bloqueo.

Mientras que los componentes biocompatibles tales como la silicona han mejorado la situación, los

trombos aún se pueden formar en la extremidad de la cánula ya sea bloqueándola totalmente o formando una válvula que hace la infusión posible pero no la extracción. Rellenar el espacio muerto de la cánula con anticoagulantes y limpiarla ayudará a prevenir la formación de dichos trombos.

El bloqueo de la cánula también puede ocurrir si la punta de ésta apoya contra la pared de la vena. Aplicar un vacío provocará que la pared sea aspirada hasta bloquear la cánula. El desbloqueo se logrará recolocando al animal o la punta de la cánula. A la hora de colocar la cánula hay que asegurar que la sangre pueda ser extraída en la posición en la que el animal estará cuando esté consciente o durante el experimento.

4.12.2 Desbloqueando una cánula

Desprender un trombo puede ser extremadamente difícil, por ello es mejor evitar bloqueos, en primer lugar, con buena destreza quirúrgica y protocolos asépticos. Si el bloqueo ocurre, habrá que aplicar una ligera succión (si se utiliza una presión mayor las paredes de la cánula de silicona se colapsarán). Desgraciadamente, pocas veces se consigue y puede que haya que intentar desplazar los trombos forzando el paso de líquido a través de la cánula. Con este sistema se consigue con más frecuencia y el émbolo resultante rara vez parece causar problemas al animal. Si llegara a causárselos, habría que pensar en sacrificarle. Si el trombo está firmemente fijado, entonces la limpieza forzada con líquidos simplemente distiende el tubo de silicona y puede incluso arrancarle de una conexión. Con cánulas más grandes es posible pasar una segunda cánula más pequeña (por ejemplo un catéter Forgerty) o un alambre de pequeño diámetro en el tubo original para desplazar físicamente el coágulo. Otras medidas incluyen la limpieza con estreptoquinasa, pero hay que tener cuidado y asegurarse que el animal no es alérgico a la estreptoquinasa o plasmina. También se puede utilizar la uroquinasa u otro enzima similar disolvente de trombos. (N.A. la Estreptoquinasa es activa en primates, perros, gatos y conejos e inactiva en roedores, ovejas, ganado vacuno, caballos y aves.)

4.12.3 Infecciones

La infección a través de la cánula puede ser evitada mediante el uso de equipo y soluciones estériles y el uso de técnicas asépticas.

Si apareciera infección, podría llevar a la formación de un trombo que se manifiesta por un incremento de las temperaturas corporales, algunas veces acompañada de inapetencia y letargo. El añadir antibióticos a la solución anticoagulante puede ayudar a limitar las infecciones. Se puede utilizar un antibiótico de amplio espectro, soluble en agua como la ampicilina, o una sulfonamida potenciada (consultar con su Veterinario titular). En cualquier caso, si la infección es persistente, lo más prudente es abandonar el procedimiento o, al menos, retirar la cánula y permitir que el animal se recupere completamente antes de insertar otra.

4.12.4 Retirada accidental

Otro problema importante en la canulación, es la retirada accidental de una cánula si el animal la engancha en la jaula o corral, o si es retirada deliberadamente por el animal o sus compañeros de jaula. El problema del enganche de la extremidad de la cánula se evita con un buen arnés (chaleco).

La retirada de la cánula por los compañeros de jaula se evita aislando el animal, aunque ésto a su vez pueda estresar al animal y llevar a resultados falsos. (ver Capítulo 4.1.). **Si un animal rasca la cánula con persistencia, consultar con el Veterinario Titular.**

4.12.5. Úlceras gástricas.

Hay evidencias en estudios sobre ratas que la sujeción de larga duración con atadura puede dar lugar a úlceras gástricas (ver Brodie *et al.*, 1966).

5 RECOGIDA DE SANGRE DE LAS ARTERIAS

5.1 Introducción

La razón principal para extraer sangre de las arterias es que se pueden obtener grandes muestras rápidamente y de manera relativamente fácil. Habitualmente se utiliza la arteria carótida. Otros ejemplos de esta técnica incluyen el sangrado de la arteria central de la oreja en conejos y, ocasionalmente, de la arteria femoral en pequeños mamíferos, por ejemplo ratas y títis. El vaso no tiene que ser ocluido, pero si el animal está estresado, la vasoconstricción aparecerá y será difícil que sangre.

Los capítulos 5.2 a 5.4 tratan de la punción con aguja, la canulación y bucles de la carótida. Muchos de los consejos y prácticas descritas para la punción venosa se aplican también a la extracción de sangre de las arterias.

5.2 Punción con aguja (especialmente en conejos)

Cuando se saca sangre de los conejos, es mejor sujetarles en una toalla para detener cualquier movimiento inadvertido que podría dañar la arteria que se está pinchando. Convendrá administrar un sedante o anestésico general. El área de la arteria se depila, se trata con una crema anestésica local (ver Flecknell, 1990) y después se limpia con un agente adecuado antes de pinchar el vaso. Se debe utilizar una aguja de 20G x 2.5 cm y la sangre se recoge en una jeringuilla acoplada de tamaño adecuado (la presión arterial habitualmente fuerza el retroceso del embolo de la jeringa). **Después de este procedimiento, hay que sujetar firmemente un algodón sobre la arteria durante al menos 2 minutos (5 minutos pueden ser necesarios) antes de soltar.** El fracaso en impedir el sangrado continuo tendrá como resultado un gran hematoma sobre la arteria lo que puede provocar un daño permanente a la oreja.

Para otros animales, el procedimiento es fundamentalmente el mismo excepto que habrá que elegir el tamaño apropiado de aguja para la especie.

5.3 Canulación

Las dos diferencias principales entre las cánulas venosas y arteriales son en su colocación y en las consecuencias al desprender un trombo. La canulación arterial puede ser una técnica más fiable para

la extracción de sangre en un periodo prolongado que el utilizar una vena.

Ha de tenerse en cuenta, la gran presión sanguínea al introducir una cánula arterial ya que cualquier abertura que no esté bien cerrada en una arteria puede sangrar profusamente. Pequeños hemóstatos no traumáticos o pinzas quirúrgicas (bulldogs) se utilizarán proximalmente (la más cerca del corazón) mientras se introduce la cánula para ocluir el flujo, o el vaso deberá ser apoyado sobre pinzas arteriales o de tejido. Siempre que sea posible, la cánula deberá colocarse en el sentido del flujo sanguíneo.

Un trombo liberado en la circulación arterial puede llegar a bloquear la circulación en un órgano al alojarse en la arteria que le abastece. Los ejemplos incluyen bloqueos de la arteria renal- especialmente la derecha- o lumbar o femoral. Se sabe que a veces los trombos se han alojado incluso en las arterias ovárica y testicular. El bloqueo de la arteria mesenterica puede llevar a la aparición de sangre en las heces. Los trombos femorales provocan cojera temporal durante unos días hasta que se establece una circulación colateral o el trombo se reabsorbe. Los trombos de la arteria femoral son muy dolorosos, provocando elevaciones de la temperatura corporal. En estos casos se recomienda seriamente la administración de analgésicos o que se ponga fin al experimento.

5.4 Bucles de la carótida

Es una técnica bien establecida para tener acceso a la circulación arterial pero sólo es útil en mamíferos grandes como perros, ovejas y ganado vacuno. El procedimiento es técnicamente difícil (Davey & Reinert, 1965) y debe aprenderse bajo la supervisión directa de una persona autorizada y experimentada.

6 PUNCIÓN CARDIACA

La punción cardíaca siempre deberá llevarse a cabo bajo anestesia general para todos los Animales de Laboratorio.

Normalmente se pincha el ventrículo izquierdo con el animal tumbado sobre el lado derecho. (Alternativamente el ventrículo derecho puede ser penetrado y el animal tumbado en el lado izquierdo para el muestreo venoso.) Otro método igualmente aceptable es tumbar el animal de espaldas e introducir una larga aguja justo debajo del esternón hasta el corazón. Es común utilizar este método para sangrías totales, pero también es útil para obtener muestras únicas de sangre en cobayas y hámsteres y ocasionalmente en los hurones. (N.A. En las ratas, para las que se intentó una recuperación del procedimiento, se registró una tasa de mortalidad de hasta el 12% después de la punción cardíaca, (Stuhlman *et al.*, 1972) y no carece de riesgo para los conejos). Cuando se aplica este procedimiento con fines terminales, hay que asegurar la muerte después de la exanguinación administrando una sobredosis de anestésico o practicando una incisión en el corazón.

La punción cardíaca repetida habrá de justificarse cuidadosamente en una autorización de proyecto debido a su potencial de efectos adversos y no se recomienda para cualquier especie - es preferible la canulación de larga duración.

6.1 Material

Las agujas para la punción cardiaca deben ser suficientemente largas para penetrar en el ventrículo. Para un solo sangrado (con la recuperación subsecuente) en animales pequeños, una aguja de 25 mm x 21-23 G será suficiente. Para otros animales el tamaño de la aguja habrá de ser aumentado en relación con el tamaño del animal. La punción cardíaca para la exanguinación en animales de mayor tamaño como conejos, probablemente se llevará mejor a cabo con una aguja de 25-50 mm x 18 G acoplada a una jeringuilla de 10 o 20 ml. También es útil tener una o dos jeringas extras listas que puedan ser acopladas rápidamente a la aguja (Ver Capítulo 6.2. a continuación). Por otra parte, un flujo sanguíneo natural puede ser suficiente sin el uso de una jeringa si la aguja está acoplada a un tubo de diámetro interior grande que lleva hasta un vaso colector.

6.2 Tomando la muestra

Se requiere anestesia general. El corazón normalmente se sitúa en el tórax en la punta del codo en la mayoría de las especies y puede sentirse o escucharse con un estetoscopio. Si el procedimiento no es con fines terminales para el animal (por ejemplo, cuando se sangra a un mamífero sin cola) entonces se deben observar precauciones asépticas. Cualquier suciedad o residuo que pueda contaminar la muestra habrá de ser retirado en primera instancia. Puede que sea suficiente apartar simplemente el pelo antes de insertar la aguja (Ver Capítulo 3.2.3). Sin embargo, si se pretende la recuperación del animal, será más aséptico depilar la zona. La aguja deberá ser suficientemente larga para penetrar en el ventrículo y se debe mantener un vacío en la jeringuilla durante la entrada de la aguja. Dirigir la aguja hacia donde se escuche el ruido más fuerte en el estetoscopio o al área en la que se sienta el máximo pulso cardíaco. Si se ha tenido éxito en la punción la sangre aparecerá en la jeringuilla. La aguja deberá fijarse en ese punto con los dedos de forma que no sea retirada del ventrículo inadvertidamente, tanto durante la extracción, como cuando se cambie de jeringuilla. El llenado y cambio de las jeringuillas se hará más fácilmente con la ayuda de un asistente; es decir, el asistente puede separar la jeringuilla llena de la aguja Afija y retirarla, la otra persona puede entonces acoplar una jeringuilla nueva.

6.3 Cuidado posterior del animal y efectos adversos potenciales.

Cualquier animal que ha de recuperarse debe ser separado de los demás animales hasta que esté completamente consciente. Debe ser mantenido caliente, cuidadosamente vigilado y sacrificado si padece un malestar que no se le puede aliviar. En las punciones cardíacas repetidas hay un riesgo de sangrado ulterior en el pericardio que conduce al paro cardíaco y a la muerte. Puede producirse fibrilación ventricular durante el muestreo pero una premedicación con atropina ayudará a evitar esta complicación.

6.4 Otros problemas

Los problemas frecuentes son: fracaso en la entrada al ventrículo, sangrado en el pericardio con paro cardíaco (a menudo debido a entradas múltiples), sangrado en el tórax debido a una perforación de un vaso sanguíneo. (N.A. los coágulos pueden ser retirados post-mortem y procesados para suero como la sangre). Se puede producir contaminación de la muestra con constituyentes pulmonares (aire, líquido o incluso pus si el animal tiene neumonía).

7. VOLUMEN DE SANGRE A EXTRAER (Ver Cuadros 3 y 4)

Si se extrae mucha sangre rápidamente, o demasiado a menudo sin reponerla, un animal puede entrar en un shock hipovolémico de corta duración y a largo plazo sufrir de anemia. La extracción de alrededor de 10% del volumen de sangre circulante iniciará los mecanismos homeostáticos coligéricos. Si se extrae entre el 15-20 % del volumen, se reducirá el gasto cardíaco y la presión sanguínea. La extracción de 30-40% puede inducir el shock hemorrágico y una pérdida de 40% puede causar una mortalidad del 50% en ratas (ver McGuill & Rowan, 1989). Volúmenes más pequeños extraídos a intervalos demasiado frecuentes provocarán anemia. Estos efectos deberían aparecer raramente y han de evitarse siempre que sea posible. Sin embargo, es fundamental poder reconocer los signos y síntomas de shock y de anemia y poder tomar las medidas adecuadas.

7.1 Reconocimiento de los signos de shock hipovolémico y de anemia

El shock hipovolémico se manifiesta por un pulso rápido y débil, membranas mucosas secas y pálidas, piel y extremidades frías, intranquilidad, hiperventilación y una temperatura corporal anormal. En casos de hipovolemia pueden utilizarse expansores de plasma, **y si el shock ocurre inadvertidamente, habrá que consultar al Veterinario.** En animales a los que se les ha extraído más del 10% de su volumen sanguíneo circulante, la reposición habitual del mismo volumen de solución salina normal templada (30-35° C) constituiría un buen procedimiento.

Los signos de anemia incluyen la palidez de las membranas mucosas de la conjuntiva o del interior de la boca, de la lengua, encías, orejas, o las almohadillas plantares (si no son pigmentadas), intolerancia al ejercicio y, en un nivel más extremo, ritmo respiratorio incrementado durante el reposo. El control individual del animal es muy importante y el método más seguro es utilizar cada animal como su propia referencia. El valor del hematocrito, el nivel de hemoglobina, el recuento de hematíes y de reticulocitos pueden ser controlados mediante una serie de sangrados cuando hay preocupación sobre el desarrollo de anemia.

7.2 Volumen

Como orientación aproximativa, hasta un 10% del volumen de sangre circulante puede ser extraída en una sola ocasión de animales normalmente sanos y bien nutridos con efectos adversos mínimos. Esto no quiere decir que el animal no experimente ningún efecto posterior - simplemente que no muestra ninguno. Este volumen puede repetirse después de 3-4 semanas. Para

sangrados repetidos a intervalos más cortos un máximo de 1 % del volumen sanguíneo circulante puede extraerse cada 24 horas.

Es decir:

0.01 H volumen sanguíneo circulante (ml /día) (aproximadamente = 0.6 ml/kg/día).

El volumen sanguíneo circulante puede generalmente estimarse en 55-70 ml/kg de peso corporal (ver Tabla 3). Sin embargo, hay que tener cuidado con estos cálculos ya que el porcentaje de sangre circulante será algo más bajo (-15%) en obesos y animales viejos.

8 EFECTOS DE LOS ANESTÉSICOS Y DE LOS SEDANTES SOBRE LOS VALORES SANGUÍNEOS.

A menos que el animal esté bien adaptado a que le saquen muestras de sangre, lo que no es usual, estará estresado durante el procedimiento (es decir, acercamiento del operador, captura, sujeción, administración de agentes inmovilizantes, obtención de la muestra). Como parte de la reacción de estrés, se producen catecolaminas (adrenalina, noradrenalina). Una de las acciones de estas hormonas es provocar que se contraiga el bazo. El bazo es un lugar de almacenamiento de glóbulos rojos y, en algunas especies, puede almacenar hasta el 25% de los glóbulos rojos del cuerpo. Cuando se contrae, se liberan glóbulos rojos a la circulación. No es una reacción anormal pero suministra a la sangre una mayor capacidad de transporte de oxígeno para afrontar una situación normal de Apelea o vuelo. Por su causa, sin embargo, el recuento de hematíes, el hematocrito y los niveles de hemoglobina (Hb) estarán artificialmente altos en las muestras de sangre obtenidas de animales conscientes estresados. Animales como gatos, perros, ovejas y cabras tienen un bazo con una gran capacidad de reacción. Sin embargo primates, aves y reptiles tienen un bazo con poca capacidad de reacción.

Algunos anestésicos generales y agentes sedantes comúnmente utilizados afectan al recuento celular y otras medidas asociadas al contraer y relajar la cápsula esplénica (ver Yale & Torhorst, 1972; Mattheij & van Pijkeren, 1977). Muchos sedantes pueden producir una relajación del bazo y entonces los hematíes se acumularán allí. En los gatos, esto ocurre por un periodo de 30-40 minutos y durante este tiempo, el número de hematíes en circulación decae. Cuando la relajación esplénica es completa, el recuento de hematíes alcanza un nivel bajo constante y el animal puede incluso mostrar pseudoanemia. Conforme vuelve la consciencia, el tono del músculo liso esplénico vuelve a la normalidad y por lo tanto el recuento de hematíes se incrementa. Las siguientes drogas provocan relajación esplénica: xilacina HCl (Rompun), promacina HCl, barbitúricos, alfaxalona-alfadolona (Althesin, Saffan), acetilpromacina, y diacepam (Valium).

En experimentos donde los valores de glóbulos rojos son importantes, hay que tener cuidado en standardizar el intervalo entre la administración del sedante (a una dosis estandar en mg/kg de peso corporal) y la recogida de la muestra de sangre. Es importante tener un buen conocimiento de la fisiología del bazo de las especies que se utilizan y de las acciones de las drogas administradas. Por

ejemplo, si se requiere una alta producción de plasma o de suero de una oveja, utilizar un sedante como xilacina y esperar 40 minutos antes de recoger la muestra de sangre.

9 GUIA DEL LIMITE DE SEVERIDAD LIGADA A LA SOLICITUD DE UNA AUTORIZACIÓN DE PROYECTO EN EL REINO UNIDO.

En el Reino Unido, la extracción de sangre se considera un procedimiento científico que puede tener efectos adversos sobre el animal y por consiguiente requiere la posesión de una licencia de proyecto.

El lugar, el volumen y la frecuencia del muestreo deberá detallarse en la Sección 19b de la licencia de proyecto. Cada procedimiento en la licencia tiene un límite de severidad previsto (en la Sección 19a) y las siguientes clasificaciones pueden servir de ayuda en la valoración.

Una única extracción de sangre (excepto para el muestreo del seno venoso orbital o la amputación de la cola) deberá considerarse que tiene un efecto Asuave A sobre el animal. Los muestreos de sangre repetidos a intervalos semanales o un muestreo que requiera más que una simple venopunción (por ejemplo, punción cardíaca) deberá considerarse como Amoderado \cong .

Cualquier forma de canulación (incluidos los bucles de la carótida) han de considerarse como Amoderada \cong debido a la cirugía requerida para preparar el animal. Sin embargo, el límite general de severidad de todas estas técnicas se consideraría suave debido a los efectos menores a largo plazo. El muestreo regular mediante cánulas implantadas permanentemente, sin embargo, se clasificaría normalmente como Asuave \cong aunque esto puede depender del volumen de sangre y de la frecuencia de la extracción de sangre. La simple extracción de sangre no debería nunca ir en la categoría Asevera \cong a menos que se estén investigando algunos aspectos sobre trauma o defecto hemostático.

10. FORMACIÓN

Los procedimientos de recogida de sangre sólo pueden ser observados y no practicados antes de solicitar una licencia personal. Dicha observación es una parte absolutamente fundamental de la formación. Las personas inexperimentadas deben examinar animales muertos para aprender la anatomía respectiva. También se puede hacer uso de demostraciones y videos de instrucción así como objetos inanimados (tales como naranjas) para familiarizarse con el manejo y utilización de agujas y jeringuillas. Después de haber obtenido una licencia personal, el trabajo ha de llevarse a cabo bajo supervisión de un poseedor de licencia adecuadamente cualificado que tenga experiencia en esta técnica. Recomendamos que el nuevo licenciado primero asista y después realice el procedimiento bajo supervisión directa (por ejemplo el supervisor deberá estar presente y no sólo localizable si se le requiere)- el supervisor deberá prevenir así como rectificar cualquier cosa que vaya mal. Dichos requisitos de supervisión también se discutirán con el Inspector del Ministerio del Interior. **No obstante, antes de llevar a cabo cualquier trabajo sobre animales vivos, dichas personas también deberán estar familiarizadas con la manipulación de estos animales y si es posible, los animales implicados deberán ser conocidos por el poseedor de la licencia. En ocasiones puede que sea necesario y útil entrenar los animales a un procedimiento, llevando a**

cabo varias pruebas ficticias y dando recompensas.

11 RESUMEN DE NORMAS DE BUENAS PRÁCTICAS

Hay varias reglas generales que se aplican a cualquier procedimiento que se lleve a cabo en un animal. Si no se observan, es probable que estos procedimientos no tengan éxito, tanto desde el punto de vista del bienestar del animal como de la validez científica. Además, estas reglas deben seguirse para cumplir con las condiciones adjuntas a la licencia personal.

- (i) Asegurarse que se tiene la licencia personal necesaria. El trabajo también debe estar cubierto por una licencia de proyecto y el operador debe estar familiarizado con todos los detalles relevantes de la Sección 19b.
- (ii) Saber lo que se está haciendo y como se va a hacer.
- (iii) Si se tiene duda sobre el procedimiento o la técnica pedir consejo.
- (iv) Disponer todo el material, antes de coger y preparar el animal, pre-etiquetar todos los contenedores.
- (v) Contar con la ayuda de un asistente familiarizado con el animal concreto, tal como un técnico en animales, siempre que sea necesario.
- (vi) Ser suave y firme con el animal
- (vii) No dejar nunca un animal desatendido.
- (viii) Si hay cualquier complicación que pueda comprometer la salud del animal pedir consejo al Veterinario, a la Persona Designada para el Cuidado Diario, o alguien experimentado con licencia.
- (ix) Si ocurre un accidente y el procedimiento va muy mal, saber como sacrificar humanamente un animal y tener disponibles los medios para hacerlo.
- (x) Poder reconocer los efectos adversos en las especies con las que se trata y saber como aliviarlos.
- (xi) Asegurarse siempre que el animal se ha recuperado satisfactoriamente del procedimiento.

Como poseedor de licencia, el bienestar del animal es en última instancia de su entera responsabilidad en todo momento.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aclimatación: acostumar a un animal a los procedimientos, las personas y los lugares en que se desarrollan.

Agudo: de corta duración. Puede incluso denotar trabajo de no recuperación (AC)

Arnés: Un aparejo diseñado para permitir a un animal llevar un dispositivo de canulación (chaleco).

Anilla giratoria (swivel): Un dispositivo por el cual el tubo acoplado a las cánulas puede ser conectado a la jaula o algún otro soporte sólido sin restringir indebidamente los movimientos del animal.

Atadura: El soporte que ata la cánula y el tubo al arnés del animal.

Barba: Carúnculas colgantes que en la mandíbula inferior tienen algunas aves.

- Canto:** La esquina del ojo, habitualmente definida como la parte interna (central) o externa (lateral). También denominado comisura.
- Cánula:** Cierta longitud de tubo hueco para insertar en un órgano o vaso sanguíneo (Contrasta con Acatéter≡ en el que la entrada se hace mediante un orificio o canal natural).
- Canulación:** El acto de colocar una cánula en el vaso sanguíneo.
- Caudal:** La parte más cercana a la cola del animal (contrario a cefálico o craneal)
- Cefálico:** La parte más cercana a la cabeza del animal (contrario de caudal). Craneal.
- Crónico:** De larga duración
- Coccígeo:** Nombre relativo a las vértebras de la cola.
- Dorsal:** Relativo a la espalda del animal.
- Émbolo (embolia):** En este contexto un trombo desprendido de la extremidad de la cánula y liberado en la circulación mediante, por ejemplo, lavado.
- Femoral (arteria):** La mayor arteria de las patas traseras situada en la ingle.
- Flebitis:** Una inflamación de la vena
- Granuloma:** Una reacción resultante de una producción excesiva de tejido inflamatorio.
- Hematoma:** Una acumulación de sangre fuera del corazón y de los vasos sanguíneos que puede formar un coágulo.
- Hipovolémico:** Un volumen bajo de sangre.
- Intravenoso:** Dentro de la vena.
- Lateral:** En la parte externa respecto al eje longitudinal del animal, en una extremidad u órgano.
- Medial:** En la parte interna respecto al eje longitudinal del animal, en una extremidad u órgano.
- Microftalmia:** Utilizado para indicar un ojo pequeño después de un trauma o de una infección que resulta en el encogimiento del ojo.
- Moco:** Apéndice carnoso y eréctil que tienen los pavos en la base del pico.
- Ocasional:** Definido aquí como un muestreo a intervalos de más de una semana.
- Ombliigo:** Un nombre común para el arnés y la atadura.
- Percusión:** Dar golpecitos suaves en un vaso sanguíneo para descubrir su recorrido.
- Perivascular:** Fuera y alrededor de un vaso, como puede ocurrir después de que se haya inyectado incorrectamente un líquido de forma intravenosa.
- Queratitis:** Una inflamación de la córnea.
- Safena:** la vena superficial que drena la extremidad posterior que puede estar localizada lateralmente sobre el jarrete o tarso.
- Trauma:** Daño físico a un tejido, por ejemplo por manipulación inadecuada.
- Trombo:** Un coágulo formado normalmente en la extremidad de la cánula.
- Tromboflebitis:** Inflamación combinada y coagulación en una vena.
- Trombosis:** El proceso de la formación de coágulos de sangre de forma que bloquee una vena o una cánula.
- Venosección:** Corte a través de la vena como con una aguja.
- Venopunción:** Penetrando en la vena como en una puñalada o pinchazo.
- Yugular:** La vena principal que desciende por el cuello.

APENDICE A

Sangrado Retro-orbital

El animal está anestesiado y suavemente sujeto por el cuello a la altura de la nuca (pescuezo) en una superficie sólida, de forma que sobresalgan los ojos. Esto puede ayudar a ocluir el retorno venoso de la cabeza y el cuello.

Hay que tener cuidado de no impedir la respiración. Se penetra entonces el seno orbital con una micropipeta, una pipeta de Pasteur o un tubo microcapilar (es decir de tamaño 100 μ l) Se le empuja a través de la conjuntiva, lateralmente (parte externa), dorsalmente (encima) o medialmente (parte interna) hasta la pared posterior de la órbita donde se pincha el seno venoso y por lo tanto se llena de sangre. Al retirar la pipeta o el tubo, la sangre exuda desde el canto (comisura) donde puede ser recogida. (N.A. Puede haber contaminación de la muestra con residuos de superficie al utilizar esta técnica). Se puede liberar momentáneamente el cuello antes de retirar la pipeta para minimizar la hemorragia del lugar de la punción. También hay que tener cuidado de no dañar la córnea mientras se presiona el globo para limitar la hemorragia después de haber obtenido la muestra. En un ratón se puede recoger 100-200 μ l con este método.

Hay discrepancia sobre si es mejor usar el canto interno (medial o lado nasal) o externo (lateral) para penetrar en la conjuntiva. Algunos consideran que el daño se minimiza al utilizar la vía lateral. En la rata, se ha sugerido que la conjuntiva sea penetrada en la parte dorsal o superior del ojo. Eso se debe a que en esta especie hay un plexo dorsal venoso más que un seno retro-orbital (Timm, 1989).

Esta técnica tiene muchos efectos adversos potenciales y han de ser totalmente considerados antes de ser utilizada. No parece que exista ningún trabajo publicado sobre los efectos posteriores, excepto un estudio reciente sobre cambios histológicos en la región orbital de las ratas después de punción orbital (Van Herck *et al.*, 1988). Es posible que el índice de alteraciones (Barclay *et al.*, 1988) pueda utilizarse para determinar la severidad de este procedimiento. Puede aparecer una hemorragia después de la recogida de sangre, con el resultado de un hematoma retro-orbital y presión excesiva en el ojo. La presión es casi con certeza dolorosa para el animal y el daño al nervio óptico y otras estructuras intra-orbitales pueden llevar a deficiencias en la visión e incluso a la ceguera. La presión de un hematoma también podría llevar a que el animal sea incapaz de cerrar el ojo, lo que a su vez puede llevar a una ulceración y rotura corneal. Otros factores adversos incluyen la posibilidad de que la micropipeta atraviese los huesos de la órbita y cause daño neural, la penetración del propio globo con una pérdida de humor vítreo, e infección que provoca la inflamación y posterior degeneración del ojo. La queratitis (inflamación de la córnea) con formación de *pannus* (proliferación de vasos sanguíneos) también es un efecto adverso común y puede ser causada por el operador al frotar las córneas mientras presiona el globo para limitar la hemorragia después de haber obtenido la muestra de sangre. Las secuelas frecuentes de algunos de estos efectos adversos es un ojo encogido (microftalmia) que es inoperante y es probable que el animal haya tenido muchos dolores en el periodo intermedio.

REFERENCIAS

- Ajika K, Kalra SP, Fawcett CP, Krulich L & McCann SM (1972) The effect of stress and nembtal on plasma levels of gonadotropins and prolactin in ovariectomised rats. *Endocrinology* **90**, 707-715.
- Barclay RJ, Herbert WJ & Poole TB (1988) *Disturbance Index Method for Assessing Severity of Procedures on Rodents*, 36 pp. Available from UFAW, 8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QD.
- Brodie DA & Hanson HM (1966) Restraint-induced gastric lesions. *Journal of Industrial Medicine* **12**, 5601-5606.
- Davey MJ & Reinert H (1965) Pharmacology of the hypertensive guanoxan. *British Journal of Pharmacology* **24**, 29-48
- Dennis MB Jr, Cole JJ & Scribner BH (1986) Vascular Access in Large Laboratory Animals. In *methods of Animal Experimentation*, Chapter 5 (eds WI Gay & JE Heavner), Vol. VII: Research Surgery and Care of the Research Animal, Part A- Patient Care, Vascular Access and Telemetry. Academic Press, pp. 143-194
- Desjardins C (1986) Indwelling Vascular Cannulas. In *Methods of Animal Experimentation*, Chapter 4, (eds WI Gay & JE Heavner), Vol. VII: Resarch Surgery and Care of the Reseach Animal, Part A- Patient Care, Vascular Access and Telemetry. Academic Press, pp. 143-194
- Flecknell PA, Liles JH & Williamson HA (1990) The use of lignocaine-prilocaine local anaesthetic cream for pain-free venepuncture in laboratory animals. *Laboratory Animals* **24**, 142-146
- Gellai M & Valtin H (1979) Chronic vascular constrictions and measurements of renal function in conscious rats. *Kidney*

- International **15**, 419-426
- Mattheij JAM & Pijkeren TA (1977) Plasma prolactin in undisturbed cannulated male rats: effects of perphenazine, frequent sampling, stress and castration plus oestrone treatment. *Acta Endocrinologica* **84**, 51-61
- McGuill MW & Rowan AN (1989) Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. *ILAR News* **31**, 5-18
- 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**, 641-642
- Sarlis NJ (1991) Chronic blood sampling techniques in stress experiments in the rat- a mini-review. *Animal Technology* **42**, 51-59
- Stuhlman RA, Packer JT & Rose SD (1972) Repeated blood sampling of *Mystromys albicaudatus*. *Laboratory Animal Science* **22**, 268-270
- Timm KI (1989) Orbital venous anatomy of the Mongolian Gerbil with comparison to the mouse, hamster and the rat. *Laboratory Animal Science*, **39**, 262-264.
- Van Dongen JJ, Remie R, Rensema JW & Van Wunnik GHJ (eds) (1990) *Microsurgery on the Laboratory Rat*, Part 1. Elsevier, pp. 159-169.
- Van Herck H, Baumans V, Van der Craats NR, Hesp APM, Meijer GW, Van Tintelen G, Walvoort HC & Beynen AC (1991) Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture. *Laboratory Animal Science* **26**, 53-58.
- Yale CE & Torhorst JB (1972) Critical bleeding and plasma volumes of the adult germ-free rat. *Laboratory Animal Science* **22**, 467-471.

OTRAS PUBLICACIONES E INFORMACIÓN

- Altmann PL & Dittmer DS (eds) (1974) *Biology Data Book*, 2nd edn, Vol. 3. Bethesda, Maryland: Federation of American Societies for Experimental Biology
- Archer RK & Jeffcott LB (eds) (1977) In *Comparative Clinical Haematology*. Oxford: Blackwell
- Aziz LA & Forsling ML (1979) Anaesthesia and vasopressin release in the rat. *Journal of Endocrinology* **81**, 123P
- Besch EL & Chou BJ (1971) Physiological responses to blood collection methods in rats. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **138**, 1019-1021
- Bivin WS & Smith GD (1984) Techniques of experimentation. In *Laboratory Animal Medicine*, Chapter 19 (eds JG Fox et al), pp. 563-594. London: Academic Press
- Brown JN, Thorne PR & Nuttall AL (1989) Blood pressure and other physiological responses in awake and anaesthetised guinea pigs. *Laboratory Animal Science* **39**, 142-148
- Cravener TL & Vasilatos-Younken R (1989) A method for catheterisation, harnessing and chronic infusion of undisturbed chickens. *Laboratory Animals* **23**, 270-274
- Depocas F & Behrens WA (1977) Effects of handling, decapitation, anaesthesia and surgery on plasma noradrenaline levels in the white rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **55**, 212-219
- Flecknell PA (1987) *Laboratory Animal Anaesthesia*. London: Academic Press
- Garner D, McGivern R, Jagels G et al. (1988) A new method for direct measurement of systolic and diastolic pressures in conscious rats using vascular-access-ports. *Laboratory Animal Science*, **38**, 205-207
- Harms PG & Ojeda SR (1974) A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular veins. *Journal of Applied Physiology*, **36**, 391-392 (This paper claims to keep cannulae patent for up to 2 months)
- Jackson RK, et al. (1988) A tethered-restraint system for blood collection from ferrets. *Laboratory Animal Science*, **38**, 625-628
- Koeslag D, Humphreys AS & Russell JC (1984) A technique for long-term venous cannulation in rats. *Journal of Applied Physiology* **57** (5), 1594-1596
- Ladewig J & Stribrny K (1988) A simplified method for stress free continuous blood collection in large animals. *Laboratory Animal Science* **38**, 333-335
- Lindsey DC, Thompson TE & Emerson TE Jr. (1990) A simple technique which maintains vascular patency after catheterisation. *Laboratory Animal Science*, **40**, 643-644
- MacLeod JN & Shapiro BH (1988) Repetitive blood sampling in unrestrained and unstressed mice using a chronic indwelling right atrial catheterization apparatus. *Laboratory Animal Science*, **38**, 603-608

- Moritz MW, Dawe ES & Holliday JF (1989) Chronic central vein catheterization for intra-operative and long-term venous access in swine. *Laboratory Animal Science* **39**, 153-155
- Nachtman RG, Driscoll TB & Gibson LA (1988) Commercial over-the-needle catheters for intravenous injections and blood sampling in rats. *Laboratory Animal Science* **38**, 629-630
- Neill JD (1970) Effect of Arestress on serum prolactin and Luteinising Hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* **87**, 1192-1197
- Otto G, Rosenblad W & Fox JG (1990) Practical venepuncture in the ferret. *Laboratory Animal Science* **40**, 565
- Palm V, Boemke W, Bayerl V, *et al.* (1991) Prevention of catheter related infections by a new catheter restricted antibiotic filling technique. *Laboratory Animals* **25**, 142-152
- Pettinger WA (1978) Anaesthetics and the renin-angiotensin aldosterone axis. *Anaesthetics* **48**, 393
- Popp MB & Brennan MF (1981) Long-term vascular access in the rat: importance of asepsis. *American Journal of Physiology* **241**, H606-612
- Schalm OW, Jain NC & Carrol EJ (1975) *Veterinary Haematology*. Philadelphia, USA: Lea & Febiger
- Scott FW & Trick KD (1982) Variation of rat serum biochemical values following decapitation or anaesthesia with ether, halothane or Innovar-Vet. *Metabolism* **31** (5), 514-519
- Smith PA, Prieskorn DM, Knutsen CA, *et al.* (1988) A method for frequent blood sampling in rabbits. *Laboratory Animal Science* **38**, 623-625
- Tappa B, Amao H & Takahashi KW (1989) A simple method for intravenous injections and blood collection in the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Laboratory Animals* **23**, 73-75
- Tsakamoto H, Reidelberger RD & French SW (1984) Long term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat. *American Journal of Physiology* **247**, R595-599
- Walsh GM, Ferrone RA, Tsuchiya M *et al.* *Hemodynamic* and metabolic responses to repeated blood sampling in the rat. *American Journal of Physiology*, **239** (6), H805-809
- Walsh TJ, Bacher J & Pizzo PA (1988) Chronic silastic central venous catheterization for induction, maintenance and support of persistence granulocytopenia in rabbits. *Laboratory Animal Science*, **36**, 467-471
- Wiersma J & Kastelijn J (1985) . A chronic technique for high frequency blood sampling/transfusion in freely behaving rat which does not affect prolactin and corticosterone secretion. *Journal of Endocrinology* **107**, 285-292 (N.B. good detail supplied for rats, on a tether and includes data on the effect of stresses due to surgery, reduction in blood volume, low and high frequency blood sampling.)
- Wuttke W & Meites J (1970) Effects of ether and pentobarbital on serum prolactin and LH levels in proestrous rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **135**, 648-652
- Zhou C & Brown LA (1988) Intravenous cannulation of chickens for blood sampling. *Laboratory Animal Science* **38**, 631-632

VIDEOS

- ABPI Inter-active video. Animal Care Training.* Dos discos disponibles al precio de 900 libras por disco (más IVA) para los no miembros (descuento por cantidad). Más amplia información disponible en la Association of the British Pharmaceutical Industry, 12 Whitehall, London SW1A 2DY.
- Handle with care and Procedures with care.* Disponible al precio de 24 libras y 32 libras (más gastos de envío y empaquetado) respectivamente. Más amplia información de Mr. T Wills, Murex, PBS Building 71, Central Road, Dartford, Kent.

Nota: Las separatas de este Informe están disponibles gratuitamente en RSPCA, Research Animal Department, Causeway, Horsham, West Sussex RH12 1 HG, UK, en su versión original en inglés y en www.lal.org.uk
 La versión en español puede solicitarse a la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL); Facultad de Medicina de la UAM; c/ Arzobispo Morcillo, 4 - 28029 MADRID. Tel: +34 91 397 54 76, Fax: +34 91 397 53 53. Email: cfcriado@uam.es, Acceso mediante Internet: <http://www.secal.es>

Tabla 1. Lugares para la venopunción y la venosección en pequeños mamíferos.

	Cef	Alar	Oreja	Ampu.	Cocc.	Orb.	Yug.	Fem.	Card.	Mam.
Gato	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
Ganado	+	-	+	-	++	-	+++	-	-	++
Pollo	-	+++	-	-	-	-	+	-	+	-
Perro	+++	-	-	-	-	-	+++	+	-	-
Hurón	++	-	-	-	+	-	+++	-	++	-
Gerbo	-	-	-	++	++	++	+	-	++	-
Cabra	+	-	-	-	-	-	+++	-	-	+
Cobaya	-	-	+	-	-	-	+	-	+++	-
Hámster*	-	-	-	-	-	+	+	-	++	-
Caballos	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
Tití	+	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ratón	-	-	+	+++	+	-	+/-	-	-	-
Cerdo	-	-	+	-	+	-	(vcc) +++	-	-	-
Macaco	+++	-	-	-	-	-	++	+++	-	-
Conejo	-	-	+++	-	-	-	+	-	+/-	-
Rata	-	-	-	+	+++	-	++	-	+	-
Oveja	+	-	-	-	-	-	+++	+	-	-

- No recomendado

+ Alternativa posible

++ Vía aceptable

+++ Via preferente

* No se ha encontrado vía preferible para el hámster o el gerbo.

* En el cerdo se utiliza la vena cava craneal y no la yugular.

Vías tales como la vena peneal y la sublingual no son aceptables debido a los efectos secundarios o al existir alternativas prácticas preferibles.

Los tamaños de las agujas han de ser del orden de 15-50 mm de largo y 14 a 26 G según el diámetro de la vena y el volumen de sangre requerida (ver Capítulo 3.2.1.). Una inyección de anestésico local bajo la piel puede reducir las molestias durante la inserción de agujas mayores (14-18 G).

Alar = vena braquial o del ala

Card. = Corazón- se debe administrar anestesia/analgesia

Cef. =Cefálica

Cocc=vena coccígea

Vcc = vena cava craneal

Oreja = vena de la oreja

Fem.= Femoral

Yug. = Vena yugular

Mamm. = Vena mamaria

Orb.= Sino venoso orbital- se debe administrar anestesia/analgesia

Saf. = Vena safena indicada por una 's' después de la clasificación +/-

Amp. = Amputación de la extremidad del rabo (arteria y vena) B Hay que administrar anestesia/analgesia.

Tabla 2. Lugares comunes para la colocación de cánulas venosas de larga duración.

	Oido	Fem.	Cocc.	Cef.	Yug.	Mam.
Gato	-	+	-	+	+++	-
Ganado	-	-	-	-	+++	++
Pollo	-	-	-	-	+++	- (Alar ++)
Perro	-	+	-	+	+++	-
Hurón	-	+	-	-	+++	-
Gerbo	-	+	+	-	+++	-
Cabra	-	+	-	-	+++	++
Cobaya	-	-	-	-	+	-
Hámster	-	+	-	-	++	-
Caballo	-	-	-	-	+++	-
Tití	-	++	+	-	++	-
Ratón	-	+/-	-	-	+/-	-
Cerdo	+	+	-	-	+++	-
Macaco	-	++	-	-	++	-
Conejo	-	+	-	-	+++	-
Rata	-	+++	+	-	++	-
Oveja	-	+	-	-	+++	+

- No recomendado

+ Alternativa posible

++ Vía aceptable

+++ Vía preferible

Alar = vena braquial o del ala

Oido = vena del oído

Fem.= Femoral

Cocc=vena coccígea

Cef. =Cefálica

Yug. = Vena yugular

Mamm. = Vena mamaria

Tabla 3. Volumen de sangre circulatoria en Animales de Laboratorio.

Especies	Volumen de sangre (ml/kg)*
Gato	47-66
Ganado	60
Pollo	60
Perro	79-90
Hurón	75
Gerbo	67
Cabra	70
Cobaya	67-92
Hámster	78
Caballo	75
Tití	-
Ratón	78-80
Cerdo	65
Macaco	54
Conejo	44-70
Rata	50-70
Oveja	60

* Teniendo en cuenta que el animal es maduro, sano y con una plan de nutrición adecuado.

Tabla 4. Valores hematológicas normales

Especies	Hematocrito (%)	Hematíes ($10^{12}/l$)	Hb (g/dl)	Reticulocito (% RBC)	Wbc ($10^9/l$)	Tiempos de coagulación (Segundos)
Gato	30-50	6.0-10.0	8-14	0-1.0	5.5-19.5	-
Ganado	24-46	5-10	8-15	-	4-12	-
Pollo	23-55	1.25-4.5	7.0-18.6	-	9-13	-
Perro	38-53	4.5-8.0	11-18	0-1.5	6.0-17.0	180
Hurón	35-51	11.3	12-17.4	-	2.5-15.4	-
Gerbo	48	7.0-10.0	12-17	-	4.3-21	-
Cabra	29-38	13.0-18.0	8-14	-	5.0-14.0	60-300
Cobaya	35-42	4.5-7.0	11-17	1.8-6.1	10.0	-
Hámster	39-59	4.0-10.0	2-30	-	7.6	55
Tití	40-55	5.3-8.1	12-19	1.0-10-0	3.0-13.0	-
Ratón	35-45	7.7-12.5	10-20	3.3-13.3	8.0	120-600
Cerdo	30-50	5.0-9.0	10-16	-	7.0-20.0	60-300
Macaco	36-43	5.6-13.4	11-13	0.5-3.0	5.6-15-4	-
Rata	35-45	7.2-9.6	12-18	1.7-21.1	14.0	20
Conejo	30-50	4.5-7.0	8-15	2.9-8.0	9.0	60-360
Oveja	29-38	8.0-14.0	10-12	-	4.0-12.0	60-300

Tener en cuenta que hay influencias considerables de raza, sexo y edad en estas cifras y hay que utilizar animales de la misma edad y sanos como controles.