

Técnicas de necropsia y toma de muestras en animales de experimentación: Una revisión bibliográfica y actualización

Necropsy and sampling techniques in experimental animals: A bibliographic review and update

A Morales Briceño ^{1,2}, M Molina ², Y Brito ², Y Moreno ², O Méndez Briñez ³,
M Álvarez Duarte ³, C Esteves ², M Moya Acosta ^{2,4}

RESUMEN

Se plantea como objetivo describir las técnicas de necropsia en animales de experimentación, una revisión bibliográfica y actualización. Se describieron las técnicas de necropsia en cobayos (*Cavia porcellus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), ratones (*Mus musculus*), la rata (*Rattus norvegicus* (variedad albina), incluyendo peces. La necropsia sistemática incluye una revisión de la historia clínica, y/o datos del experimento realizado. El siguiente paso corresponde al examen externo, donde se describen lesiones sobre el tejido tegumentario, sistema locomotor, mucosas, cavidades naturales y cambios post-mortem. Posteriormente se realiza el desollado, de manera simultánea la apertura de cavidades, con la evaluación de órganos, mediante un exhaustivo examen macroscópico. Este procedimiento continua con la extracción de órganos y toma de muestras. Por último se debe elaborar un informe de necropsia donde el patólogo veterinario emitirá las conclusiones o diagnósticos comentarios, recomendaciones y las apreciaciones enmarcados en la epicrisis del caso. El proceso de necropsia junto con la recolección y envío de muestras apropiadas para la realización de pruebas de laboratorio es trascendental en el proceso de emisión de un diagnóstico, de la práctica de la toma de muestra y envío al laboratorio depende el diagnóstico morfológico y etiológico. En conclusión se describieron las técnicas de necropsia y toma de muestras en animales de experimentación con énfasis en cobayos (*Cavia porcellus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), ratones (*Mus musculus*), la rata (*Rattus norvegicus*, variedad albina), incluyendo peces, como una herramienta básica para el diagnóstico de patologías en animales de experimentación así como se mencionaron las condiciones de envío de muestras a los distintos laboratorios.

PALABRAS CLAVES: Experimentación, necropsia, patología, técnicas de necropsia, toma de muestras, animales de experimentación.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the necropsy techniques in experimental animals, a literature review and update. Necropsy techniques were described in guinea pigs (*Cavia porcellus*), rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), mice (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus* (albino variety), including fish, systematic necropsy includes a review of clinical history, and/or data of the experiment performed. The next step corresponds to the external examination, where lesions are described on the integumentary tissue, locomotor system, mucous membranes, natural cavities and post-mortem changes, followed by flaying, simultaneously opening cavities, with the evaluation of organs, through an exhaustive macroscopic examination. This procedure continues with the extraction of organs and sampling. Finally, a necropsy report must be prepared where the veterinary pathologist will issue the conclusions or diagnoses comments, recommendations and assessments framed in the epicrisis of the case, the necropsy process together with the collection and shipment of appropriate samples for the performance of laboratory tests is crucial in the process of issuing a diagnosis, the practice of sampling and sending to the laboratory depends on the morphological and etiological diagnosis. In conclusion, necropsy and sampling techniques were described in experimental animals with emphasis on guinea pigs (*Cavia porcellus*), rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), mice (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus* albino variety), including fish, as a basic tool for the diagnosis of pathologies in experimental animals, as well as the conditions for sending samples to different laboratories.

KEYWORDS: experimental, necropsy, pathology, techniques of necropsy, collection of samples, experimental animals.

¹Departamento de Anatomía Patológica Comparada, Colegio de Medicina Veterinaria, Universidad de Córdoba, España. Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid km 396, 14071, Córdoba, España.

²Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Caracas Venezuela.

³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.

⁴Instituto de Medicina Experimental "Dr. José Gregorio Hernández Facultad de Medicina UCV.

Email: aamorales13@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La necropsia ha sido durante siglos fuente fundamental de la anatomía patológica; de tal modo, con fines diagnósticos constituye una base imprescindible para el estudio de las enfermedades. Así mismo, es una pieza fundamental en el desarrollo de la medicina experimental y en la anatomía patológica experimental¹.

La necropsia se define como un estudio sistemático post-mortem de un cadáver animal². El proceso de necropsia junto con la recolección y envío de muestras apropiadas para la realización de pruebas de laboratorio es trascendental en el proceso de emisión de un diagnóstico.

En los animales de laboratorio la necropsia representa una valiosa herramienta para la obtención de datos como causa de muerte, el grado de enfermedad o lesión, el efecto de la terapia o la identificación de alguna condición patológica no detectada ante mortem, el proceso de toma de muestras durante las necropsias debe estar determinado por la naturaleza de la muestra y los objetivos que persigue el investigador para tener un valor diagnóstico.

Los principales objetivos del proceso de necropsia en animales de laboratorio son evaluar los problemas de enfermedades, incluida la disminución de la producción, en las colonias de cría en los bioterio, evaluar problemas de enfermedades en animales de investigación durante los estudios, confirmar y caracterizar fenotipos u otros puntos finales de investigación, caracterizar y validar los modelos de investigación traslacional.

La situación ideal es que la necropsia sea realizada en una sala de necropsias por un anatomopatólogo o por veterinarios especialistas con formación en anatomía patológica en la especie animal experimental. Previamente a cualquier necropsia, se debe estudiar la historia clínica en la que se indaga la enfermedad fundamental, la posible causa de muerte y la posible conexión entre ambas, así se puede tener una idea más clara de qué órganos se deberán estudiar con mayor detenimiento sin menospreciar el resto de los órganos¹.

La utilización de animales en la investigación conlleva una serie de responsabilidades. Con el fin

de lograr una buena práctica con los animales es necesario establecer una serie de normas o regulaciones³, que se encuentra regulado en cada país. La Asociación Venezolana para la Ciencia de los Animales de Laboratorio (AVECAL) es una Asociación Civil sin fines de lucro con personalidad jurídica Fundada el 1 de octubre de 1996, formada por profesionales universitarios, técnicos e interesados en el mejoramiento de la producción, calidad sanitaria y el uso ético de las especies animales empleadas en investigación y la Red Nacional de Bioterios⁴. A partir de diciembre del 2006 la Asociación forma parte de la Federación de Asociaciones Suramericanas de la Ciencia en Animales de Laboratorio (FESSCAL).

En Venezuela el artículo 52 de la ley para la protección de la fauna doméstica libre y en cautiverio tomado de la Gaceta Oficial 39338 del 4 de enero de 2010, en su Capítulo III De la utilización de animales domésticas en investigación⁵. Se permite la utilización de animales domésticos vivos para investigación en centros destinados para ello y legalmente facultados por la autoridad competente, cuando sean necesarios para el estudio y avance de la ciencia en materia de diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano u otros seres vivos. Tal utilización no menoscaba el cumplimiento de la normativa legal vigente que regula esta materia. En cuanto a las prácticas de laboratorio en la misma ley, en su artículo 53. Sólo se permite la utilización de animales domésticos en las unidades de educación básica y diversificada, institutos universitarios o universidades para el desarrollo de prácticas de laboratorio, contenidas en los pensum de estudios aprobados por las autoridades competentes, cuando no haya disponibilidad de otros métodos o técnicas que permitan obtener iguales o similares resultados.

En cuanto a la aplicación del sacrificio sin dolor en el artículo 54. 315. Los animales domésticos que sean sometidos a experimentación y que resultarán afectados en sus condiciones físicas de manera irreversible o cuyo sacrificio sea inevitable, de acuerdo a los protocolos de investigación, serán sometidos al sacrificio sin dolor de rigor. En cuanto a la vivisección en su artículo 55.

Se prohíbe la vivisección de animales domésticos por parte de personas sin la formación profesio-

nal correspondiente o que carezcan de la asesoría profesional en la materia. Una variedad de modelos animales para enfermedades humanas desempeña un papel esencial en la investigación biomédica, incluido el análisis patogénico y el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades raras y / o incurables⁶.

Los modelos animales que actualmente se emplean en Neurociencia, incluyen: vertebrados: peces, anfibios y mamíferos (principalmente roedores) e invertebrados: nematodos, artrópodos y cefalópodos. Las posibilidades que ofrecen estos animales como modelos experimentales, sus limitaciones, posibles alternativas varían entre una especie y otra.

El Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, a través de su Bioterio Central cuenta con un la producción de cobayos (*Cavia porcellus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), ratones (*Mus musculus*) y la rata (*Rattus norvegicus*, variedad albina), así como equinos, gansos y ovinos para la producción de hemoderivados. En virtud de esta importante área de estudio se plantea como objetivo describir las técnicas de necropsia en animales de experimentación, una revisión bibliográfica y actualización con énfasis en cobayos (*Cavia porcellus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), ratones (*Mus musculus*), la rata (*Rattus norvegicus*, variedad albina), incluyendo peces.

TÉCNICAS NECROPSIA REVISADAS Y ESTUDIADAS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Consideraciones generales para realizar la técnica de necropsia y toma de muestra. Las consideraciones generales para realizar la técnica de necropsia incluye la especie animal, datos de la historia clínica, equipo de bioseguridad en este caso disponer de las condiciones de un laboratorio de patología con campana de bioseguridad, bioseguridad personal (incluye: bata de laboratorio, guantes, lentes, botas, máscaras con filtro de aire, entre otros).

Las condiciones de bioseguridad dependen de la naturaleza del experimento y su potencial patógeno y tóxico. Se debe disponer de un instrumental mínimo (incluye: bisturí, pinzas, tijeras, entre otros). Así como los medios de fijación requeridos formalina al 10%, u otro medio como Bouin y Da-

vidson. Por último, el descarte del cadáver y sus restos considerando su potencial infeccioso y tóxico, garantizando niveles de bioseguridad.

La eutanasia se puede definir como inducir la muerte sin dolor. Está considerada en muchos experimentos como parte del procedimiento de necropsia. La eutanasia depende de la naturaleza del experimento, ya que puede inducir alteraciones en tejidos y órganos, de manera bioética se puede realizar de varias maneras utilizando una cámara con campana con un algodón impregnado con cloroformo, o cámara de CO₂, de manera mecánica por dislocación cervical, congelación e inclusive por métodos químicos principalmente empleando anestésicos (barbitúricos).

A continuación, se ilustra las condiciones generales para realizar la técnica de necropsia y toma de muestras.

Técnica de necropsia en animales de experimentación:

Cobayos: El cobayo (*Cavia porcellus*) es un roedor de pequeña talla perteneciente al Orden Rodentia y a la Familia Caviidae, utilizado como animal de laboratorio y de consumo humano.

A continuación, se describen los pasos para la necropsia en cobayos:

Historia Clínica: Revisar la historia clínica, chequeando la identificación del animal y que los datos coincidan con los registrados, los datos recogidos con anterioridad nos ofrecen información acerca de la evolución de la enfermedad, tratamientos administrados, exámenes de laboratorio realizados, algunos autores sugieren registrar el peso⁷.

Examen Externo: El cadáver debe ser examinado detenidamente, revisando color, sexo, condición corporal, pelos, buscar heridas superficiales y fracturas. Los orificios naturales se inspeccionan, buscando exudados, signos de diarrea, cambios de color o lesiones en las mucosas. En oído externo se buscan exudados, presencia de parásitos y en los ojos se revisan la córnea y la mucosa ocular. Apertura de cavidades: Algunos autores como Feldman sugieren empezar iniciar con la colección de órganos como ojo, glándula de Harder, glándula lagrimal intraorbital, glándula salival cigomática y parótida, ya que la autólisis inicia más temprana-



1.- Esquema: Consideraciones generales para realizar la técnica de necropsia en animales de experimentación. (Fuente: Departamento de Patología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Diplomado Patología en Animales de Experimentación, Julio-Octubre, 2017).

mente en estos órganos, luego proseguir con la disección de masas en piel. Preferentemente antes de abrir las cavidades se examinan las cavidades articulares.

Desollado: Primero se incide la piel y teniendo el miembro por examinar en flexión, se separan ligamentos para poder observar superficies articulares, membranas sinoviales, así como color y consistencia del líquido sinovial⁸. Luego se procede a colectar masas cutáneas. Posteriormente se debe colocar al animal de cubito dorsal, algunos autores como sugieren mojar al animal con alcohol para evitar la dispersión de los pelos, Aluja, Aistaiza y Feldman proponen iniciar con una incisión primaria, cortando la piel a lo largo de la línea media desde la unión de las dos ramas de la mandíbula hasta el ano, realizando tracción de la piel con una pinza para evitar lesionar los órganos internos. Para separar la piel, se efectúan costes perpendiculares a la línea media en cada región axilar y en las dos inguinales. Se separa parcialmente la piel de cada lado y se puede proceder al desollado completo antes de realizar el estudio post-mortem y se examina el tejido subcutáneo, los músculos y los nódulos linfáticos explorables. Por medio de cortes paralelos a lo largo de la parte interna de las ramas del maxilar inferior se llega a la cavidad bucal y se extrae la lengua haciendo tracción en dirección del cuello. Se desarticulan los huesos hioides y se examinan la mucosa de la cavidad, los dientes, la laringe y la faringe, así como las tonsilas y los nódulos linfáticos submaxilares, retro faríngeos, parotídeos y la glándula parótida. Realizando tracción de la lengua hacia atrás de cortan los músculos del cuello, a lo largo

del trayecto de la tráquea, examinando tiroides y paratiroides. De este modo se liberan la tráquea y esófago, unidos a la lengua y laringe, hasta la entrada a la cavidad torácica.

Para la exposición de vísceras abdominales, se hace siguiendo el corte de la línea media, de las apófisis xifoides hasta la sínfisis pubiana. Durante este paso debe tenerse cuidado de no incidir estomago o intestino. Se puede utilizar una pinza para levantar el segmento que se desea incidir o utilizar los dedos índices y medio, levantando con ellos la pared abdominal y cortando entre los dos, siguiendo la línea media, con el filo del cuchillo hacia arriba o en animales pequeños, con la tijera, introduciendo la punta roma. En este momento se revisa el peritoneo, la posición de las vísceras, el líquido peritoneal y se toman muestras que se juzgen necesarias para exámenes bacteriológicos, con el fin de evitar la contaminación causada por manipulaciones posteriores. Con un cuchillo o bisturí se traza una línea desde la última costilla. Se procede a inspeccionar las vísceras torácicas en posición, registrando posibles cambios en pleura pulmones, corazón liquido pleural, tomando muestras, en su caso, para exámenes microbiológicos.

Otro método que resulta practico para para incidir las cavidades de manera rápida es utilizar una pinza diente de ratón para elevar la piel de la región inguinal y una tijera para realizar una incisión longitudinal hasta el cartílago xifoides, luego prolongar la incisión para abordar cavidad torácica y continuar hasta la línea media desde la unión de las dos ramas de la mandíbula. De esta manera se

exponen las vísceras en un solo corte. Posteriormente se realizan 2 cortes paralelos a las ramas de las mandíbulas, para desprender la lengua, lo cual los permitirá utilizarla para la extracción de tráquea y vísceras torácicas y abdominales.

Extracción de Órganos: El timo en esta especie se encuentra extra torácico, a diferencia de otras especies como ratón, conejo, hámster. Al halar de tráquea y esófago con la lengua, que ya habían liberado anteriormente, hacia atrás, se levantan los pulmones con el corazón y la parte torácica de la aorta separando las adherencias pleurales a nivel de la columna vertebral y torácica. Debe cuidarse de no lesionar ni pericardio, ni nódulos linfáticos mediastinales, ya que estas estructuras son de gran importancia para el examen posterior. Al llegar al diafragma, se liga el esófago y se corta este. De igual forma también es posible disecar el diafragma y continuar separando el paquete de vísceras utilizando un bisturí para cortar las adherencias, teniendo cuidado de no lesionar los órganos, hasta llegar el recto y cérvix y procedemos a cortar recto y cérvix.

Para el sistema nervioso se toma una porción del plexo braquial; en la extracción de la masa encefálica se debe ubicar la articulación atlanto-occipital y seccionarla. Teniendo separado el cráneo, se retira la piel y se realiza cortes diagonales, ayudado

de unas tijeras, desde el foramen magno hasta el hueso temporal, luego se realiza un corte en el hueso parietal, uniendo los anteriores; ya expuesta la masa encefálica, con ayuda de una pinza se extrae. En caso de requerir una muestra de piel se debe despejar la zona a muestrear, obteniendo un corte de ésta, incluyendo tejido sano. Las muestras tomadas durante éste procedimiento están sujetas a los hallazgos macroscópicos en los diferentes órganos y tejidos⁹.

Inspección *In situ*: Una vez extraídos los paquetes de vísceras abdominales y torácicas, se procede a la separación de sus diferentes partes. Para cada una de ellas, deben registrarse los datos referentes a forma, color, tamaño, aspecto de superficies, presencia de exudados o neoformaciones y consistencia. Primero se observa, luego se palpa y por último se corta cada órgano. Para la inspección del tracto gastrointestinal se sigue como rutina la revisión exterior de mesenterios, linfonodos mesentéricos, páncreas, hígado, bazo y cada segmento intestinal. En el sistema músculo esquelético se toma una muestra de hueso, incluyendo médula en el miembro posterior a nivel femoral. En forma rutinaria solo se inspeccionan articulaciones de las extremidades y costillas⁹.

Conejos: En conejos (*Oryctolagus cuniculus*) se realiza la técnica de necropsia de la siguiente manera:



Figura 1.- Técnicas de necropsia en cobayos (Fuente: Departamento de Patología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Diplomado Patología en Animales de Experimentación, Julio-octubre, 2017).

Examen Externo: el examen clínico consiste en la inspección y palpación del cadáver.

Desollado: Se realiza el desollado siguiendo la línea media ventral desde la sínfisis mentoniana, hasta la entrada del pubis.

Apertura de Cavidades: Se incide la cavidad abdominal (apertura de cavidades), por la línea media ventral continua con la cavidad torácica.

Evaluación *In situ*: Se inspeccionan todas las cavidades y órganos en su respectivo lugar anatómico. En muchos casos posterior al procedimiento anterior (apertura de la cavidad torácica y abdominal) el cadáver completo se fija directamente en formol, al 10%, a las 24 horas se toman las muestras ya fijadas, esto se realiza como medida de bioseguridad, en caso de enfermedades infecto-contagiosas.

Extracción de Órganos: la extracción de vísceras se realiza mediante un corte a nivel del recto, por corte y tracción se van a extraer todas las vísceras de la cavidad abdominal. A nivel de la tráquea se realiza un corte transversal y se extrae la tráquea, esófago, pulmón y corazón. El Sistema Nervioso Central, se extrae realizando un corte transversal a nivel de los forámenes supraorbitario y dos cortes laterales (sagitales), a nivel de los huesos parietales. Una vez extraídos los órganos del cadáver se procede al examen de órganos, inspección y palpación.

Ratones: En ratones (*Mus musculus*), se recomienda fijar al animal en la placa de disección, en los cuatro miembros, este debe estar de cubito ventral, la finalidad es tener más comodidad al realizar la necropsia, evitando la movilidad del animal mientras se realizan las incisiones y extracción de órganos.

Primera incisión: Incida la piel con un bisturí en la línea alba, desde las mandíbulas al pubis. En los machos, la incisión debe terminar en ambos lados del pene, también se puede retirar la piel cortando con una tijera. Se examina la piel y el tejido subcutáneo buscando lesiones o cambios morfológicos, aquí se confirman las lesiones observadas en el examen clínico. También se examinan glándulas mamarias.

Segunda incisión: Apertura de cavidad abdominal; se toma la pared abdominal con una pinza cerca del cartílago xifode levantándolo firmemente, se realiza una incisión para dejar entrar el aire para separar las vísceras de la pared abdominal. Se termina de cortar la pared abdominal por la línea media con una tijera desde la pelvis hasta el cartílago xifoide cerciorándose de no romper alguna víscera. Se coloca la pared de cada lado de la cavidad hacia afuera exponiendo las vísceras, se examina peritoneo, buscando adherencias o peritonitis. Se observan órganos *in situ*. Para retirar los órganos de la cavidad abdominal se toma el diafragma con las pinzas, cortando en su extensión más profunda, y retrayendo suavemente

para levantar todos los contenidos abdominales juntos. Las glándulas suprarrenales y los riñones tienden a permanecer, en las profundidades del espacio retroperitoneal, estos son retirados junto con uréteres y vejiga juntos, con una tijera de disección roma. Al igual que los riñones se retira igual el siste-



Figura 2.- Técnicas de necropsia en conejos. (Fuente: Departamento de Patología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Diplomado Patología en Animales de Experimentación, Julio-octubre, 2017).



Figura 3.- Técnicas de necropsia en ratones. (Fuente: Departamento de Patología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Diplomado Patología en Animales de Experimentación, Julio-octubre, 2017).

ma reproductivo, pero para ello se debe dividir la pelvis.

Tercera incisión: apertura de cavidad torácica; se levanta el cartílago xifoide y se realiza un corte anterior a través de las costillas y clavículas, para exponer la cavidad torácica. Se examinan los órganos *in situ*, señalando fluido o masas, y ausencia o agrandamiento del timo. Se procede a cortar la sínfisis mandibular, se examina la cavidad oral. Con unas tijeras se separan las ramas mandibulares para exponer la lengua, se sujeta la lengua con pinzas, y con un bisturí o una tijera roma se retrae suavemente hacia abajo para extraer lengua, laringe, tráquea y esófago de la cabeza y el cuello. Se continúa retrayendo para separar el corazón, timo, y pulmones, con la aorta terminando para así de esta manera extraer el bloque torácico.

Extracción de encéfalo: se comienza cortando y exponiendo la piel de la cabeza, haciendo una incisión mediana-longitudinal desde la nuca hasta el hocico, se retira la piel hasta dejar totalmente expuesto el cráneo. Se fija la cabeza firmemente con grandes pinzas, y se inserta la punta de la tijera en la cuenca del ojo izquierdo (evitar cualquier daño a la ojo-bola), y cortar el hueso nasal transversalmente a nivel del tabique nasal entre las dos cavidades orbitales. Luego, cortar progresivamente el hueso parietal, y los huesos occipitales en

dirección cráneo-caudal en ambos lados para hacer una tapa. Se retira superficie la bóveda del cráneo con unas pinzas y finalmente se expone el cerebro. Se levanta el cerebro mediante la introducción suavemente fórceps bajo lóbulo frontal del encéfalo. Se debe manejar con cuidado el cerebro entre el pulgar y el dedo índice para evitar dañarlo. Use una tijera oftalmológica para cortar las vértebras, empezando desde el nivel hueso occipital y luego, con la punta de la tijera, corte las vértebras de lado derecho e izquierdo para eliminar progresivamente los arcos vertebrales. Así, la médula espinal será descubierta en el canal vertebral.

Ratas: En ratas (*Rattus norvegicus*, variedad albina), la técnica de necropsia se describe a continuación: Examen Externo: Evaluar su condición corporal, observar el pelo, la piel, lesiones externas, entre otras. Pesar al animal. Registrar cualquier lesión externa (lesiones cutáneas, pérdida o decoloración de pieles y masas subcutáneas). Revisar y registrar los cambios de color de la piel y las mucosas (gingival, mucosa genital, conjuntiva). Examinar los ojos, la boca, los dientes y las aberturas nasales y registrar cualquier anomalía. Examinar la región ano-genital para buscar signos de diarrea, prolapso rectal o vaginal y registrar cualquier anomalía. Palpar suavemente el abdomen para revelar las masas abdominales o la presencia de líquido. Si el abdomen está distendido por el líquido, tomar una muestra con una aguja y una jeringa estériles para una evaluación posterior. Palpar cualquier masa y registrar su consistencia (suave, fluctuante, firme o dura). Desollado: Realizar una incisión en la piel con un bisturí en la línea media, desde la sínfisis mandibular hasta el pubis. Retirar la piel hacia ambos lados de la incisión. Examinar la piel y el tejido subcutáneo y registrar cualquier lesión. Examinar las glándulas mamarias, las ratas tienen seis pares (tres torácicos y tres abdominales). Examinar los ganglios linfáticos superficiales, estos deben ser grisáceos y bilaterales, siendo los principales ganglios linfáticos el cervical, axilar, braquial, inguinal y poplíteo.

Apertura de cavidades: Se sujeta la pared abdominal con una pinza cerca del apéndice xifoide y se levanta firmemente. Cortar la pared abdominal en la línea media con unas tijeras desde la pelvis

hasta el apéndice xifoide, asegurándose de no cortar ninguno de los órganos abdominales que se encuentran debajo. Retirar la pared abdominal a ambos lados. Examinar la membrana serosa abdominal y buscar la presencia de contenido anormal, como el líquido seroso, sangre o fibrina, así como cualquier adherencia entre la pared abdominal y los órganos abdominales. Comprobar la posición de los diferentes órganos *in situ*. Con un costotomo, o en el caso de la rata, con una tijera de disección fuerte y estable se toma el apéndice xifoide y se procede a cortar a nivel de las articulaciones costo-condrales en dirección caudo-craneal hasta el primer par de costillas. Se retira de esta manera todo el esternón y se evalúan los órganos *in situ* de cavidad torácica al igual que los que se encuentran ventral al cuello, con el fin de evaluar las características macroscópicas y posibles alteraciones orgánicas.

La evaluación del sistema nervioso es de suma importancia cuando se sospeche de alguna afección a este nivel, por lo que se deben conocer los signos clínicos básicos de las alteraciones a nivel del sistema nervioso, como lo son: ataxia; pérdida de la movilidad de un miembro, miembros posteriores, los cuatro miembros o mitad del cuerpo; pérdida o aumento de la sensibilidad, entre otros. Para realizar la apertura de la cavidad craneana se debe retirar la piel de la cabeza y la mayor cantidad de músculos y tejido de la zona. Se debe emplear una sierra pequeña o una tijera de disección fuerte en el caso de animales jóvenes, con la cual se realizarán los cortes o incisiones a nivel de una línea imaginaria

transversal sobre los agujeros supraorbitarios y dos líneas perpendiculares y oblicuas que partan de la primera incisión mencionada en sentido caudal para encontrarse en el agujero magno. Posterior a ello se retira toda la porción dorsal del cráneo con sumo cuidado para no desgarrar las meninges o traumatizar el tejido nervioso en caso que hayan adherencias. Se evalúa el tejido nervioso macroscópicamente observando la superficie más externa de las leptomeninges, valorando el color y observando algún tipo de hemorragia existente, de igual forma se evalúan los pares craneales y sus posibles alteraciones.

Extracción de órganos y vísceras: Insertar las tijeras entre el colon y la pelvis para cortar el arco pélvico en ambos lados para facilitar la remoción del tracto genital y urinario del recto. Sostener el recto y levantarlo hacia arriba. Extraer gradualmente las vísceras en dirección caudo-craneal, mientras se corta la inserción del mesenterio lo más cerca posible a cada órgano. Es necesaria una incisión el esófago por debajo del diafragma en el abdomen para posteriormente extraer ese conjunto de vísceras de la cavidad abdominal. Con las tijeras se procede a cortar las inserciones costales del musculo diafragma y de igual forma en sentido craneal se remueven los órganos de la cavidad torácica. Una vez a nivel de las ramas de la mandíbula se realiza divulsión la raíz de la lengua de toda la musculatura de sostén para extraer así la porción más craneal del sistema digestivo, todo el sistema respiratorio y el corazón con sus grandes vasos.



Evaluación de órganos *ex situ*: Una vez que se tienen todas las vísceras internas fuera de las cavidades torácica y abdominal se procede a realizar la evaluación sistemática de todos los órganos, siendo este uno de los momentos más importantes de la necropsia, donde se registraran los pesos previamente mencionados, así como la valoración subjetiva de la conformación y estado

Figura 4.- Técnicas de necropsia en ratas. (Fuente: Departamento de Patología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Diplomado Patología en Animales de Experimentación, Julio-Octubre, 2017).

de cada órgano. Es recomendable separar cada sistema para hacer su evaluación por separado (respiratorio, cardiovascular, digestivo, urinario y reproductivo).

Peces: La técnica de necropsia en peces se describe a continuación:

Primera etapa (Examen Externo): Evaluación de la anatomía externa: Cuando se observa un pez sobre la bandeja de disección apreciamos claramente tres zonas: Región cefálica, troncal y caudal. En la región cefálica encontramos la boca en la porción anterior; al abrir las mandíbulas aparecen la dentición y la lengua (se recomienda utilizar una lámpara estereoscópica). Dos narinas se abren a ambos lados de la nariz del pez con función olfatoria. Las agallas de color rojo pardo oscuro de aspecto plumoso se encuentran debajo de las tapaderas operculares. Los ojos no presentan párpados y apenas pueden moverse. Un corte longitudinal del ojo permite extraer el cristalino. En la región troncal tenemos desde el opérculo hasta la aleta caudal la línea lateral que es un órgano sensor que permite detectar el movimiento y las vibraciones del agua. Las aletas permiten al pez estabilizarse, moverse y frenar cuando es necesario. En general el movimiento del pez lo provoca la musculatura troncal y el impulso de la aleta caudal; las aletas dorsales y ventrales estabilizan el movimiento para que no gire sobre sí mismo y las pectorales y pelvianas ayudan a equilibrar el organismo; igualmente estas aletas intervienen en el frenado y giro. Finalmente, en la región caudal estarán ubicadas las aletas caudales, las cuales establecen su simetría, la más común es la homocerca (lóbulos iguales) dentro de los teleósteos y la heterocerca (lóbulos desiguales) entre los condrocitos. Todas las aletas constan de una porción membranosa y una serie de radios espinosos duros o flexibles de gran importancia taxonómica.

Segunda etapa (Evaluación *in situ*). En esta etapa de la necropsia es muy importante realizar una evaluación macroscópica detalladamente de cada uno de los órganos para poder obtener buenos resultados de todo el estudio y dar finalmente con el diagnóstico de la patología presente en el individuo. Para observar la musculatura se retirará la epidermis de la siguiente manera: Se incide la piel detrás del opérculo con unas tijeras de disección y después se hace un rectángulo entre la línea la-

teral, opérculo y ano. Se separa con cuidado y se observa la disposición de los haces musculares. A veces la separación de la piel se puede hacer mejor tirando firmemente con los dedos haciendo previamente una pequeña escotadura con las tijeras. Se evalúa detalladamente toda la musculatura y parte interna de la epidermis. Para observar las vísceras del animal se procede a realizar un corte de la masa muscular desde la barbilla hasta el ano, posteriormente se hace una incisión con el bisturí hasta la aleta dorsal y se levanta todo el tejido muscular. A continuación de la boca aparece el esófago que conecta la faringe con el estómago, a partir del estómago se aprecian las criptas gástricas que vierten jugos gástricos al interior del tubo digestivo. Seguidamente aparece el intestino precedido por la válvula pilórica, seguido por el intestino hasta llegar a la cloaca. Los riñones y gónadas también vierten sus productos en esta cloaca. A lo largo del eje antero posterior se disponen los demás órganos. El hígado está en posición dorsal, anclado por tejido conectivo a la columna vertebral. La bilis producida por el hígado se acumula en la vesícula biliar de color verdoso. El bazo se encuentra en la zona próxima al extremo posterior del estómago. Incidir el opérculo y observar las branquias en el interior. En el sistema digestivo observaremos el esófago musculoso, el estómago, los ciegos pilóricos, el hígado (de gran tamaño), la vesícula biliar situada bajo el hígado, el bazo unido al ángulo posterior del estómago (color rojo). Se debe incidir a nivel del esófago y extraerlo. En la parte superior de la cavidad visceral se encuentra la vejiga natatoria llena de gas. Tras la vejiga natatoria se encuentran los riñones alargados y de color oscuro. Las gónadas tanto en machos como en hembras son unas masas alargadas dispuestas longitudinalmente en la cavidad visceral. El sistema circulatorio presenta el pericardio que contiene el corazón se encuentra en la parte anterior del animal bajo las branquias. El corazón consta de una aurícula (masa blanda e irregular de color rojo oscuro), un ventrículo. Muy musculoso de forma piramidal y el bulbo aórtico que posteriormente se bifurca hacia las branquias. En el aparato respiratorio debemos abrir cuidadosamente la cavidad branquial levantando el opérculo y evaluar la condición de los arcos branquiales. Extraer uno de ellos y observar las laminillas que forman las branquias, así como los finos dientes de la cara interna (branqui-espinas). Para observar bien el esqueleto es necesario separarlo de la musculatura los que

del animal. Se debe realizar la evaluación del sistema nervioso separando una de las vértebras para seccionar el cráneo cuidadosamente a la altura de ojos, separando el hueso y extraer el encéfalo. Igualmente se debe seccionar el animal y evaluar el aspecto de la medula espinal y órganos de los sentidos.

Informe de Necropsia: Es el informe escrito donde el patólogo veterinario emitirá las conclusiones o diagnósticos comentarios, recomendaciones y las apreciaciones enmarcados en la epicrisis del caso. El informe de necropsia es un documento legal. Este deberá contener la identificación del animal, su historia clínica, descripción de lesiones macroscópicas, los exámenes de laboratorio realizados, el diagnóstico (presuntivo y/o definitivo) y las observaciones o recomendaciones. La descripción de las lesiones debe considerar: tamaño, forma, superficie, coloración, consistencia, textura y superficie.

Toma de muestras en animales de experimentación: La recolección de muestras de efusiones, fluidos, tejidos y órganos es un procedimiento complementario a la necropsia. Es fundamental la toma de muestras y la respectiva identificación, ya que se presenta como un único momento y oportunidad antes de eliminar los restos del cadáver animal. El proceso de necropsia junto con la recolección y envío de muestras apropiadas para la realización de pruebas de laboratorio es trascen-

dental en el proceso de emisión de un diagnóstico, de la práctica de la toma de muestra y envío al laboratorio depende el diagnóstico morfológico y etiológico. La recolección de muestras se realiza a juicio del patólogo veterinario y varía dependiendo de la historia clínica, naturaleza del modelo experimental, así como las posibles etiologías y por último la disponibilidad de laboratorios especializados, por lo tanto, es de exclusiva responsabilidad del patólogo veterinario.

A continuación se describe el tipo de muestra y las condiciones requeridas:

Muestras para exámenes hematológicos: Los recipientes para enviar muestras por lo general son de plástico o de vidrio y deben empacarse cuidadosamente para evitar su ruptura durante el transporte. En caso de animales vivos puede ser útil tomar algunas muestras previo a la eutanasia, como sangre y líquido cefalorraquídeo.

En el caso de animales de laboratorio se puede tomar la muestra a partir del seno orbitario y/o punción cardiaca, utilizando agujas calibre N°21 y 22. Una vez tomada se procede a realizar un frotis de sangre fresca para la evaluación morfológica de las células sanguíneas, así como el conteo diferencial de células sanguíneas, inclusive descarte de hematozoarios el resto de la sangre colectada se debe depositar en un tubo que contiene el anticoagulante (Citrato, EDTA, heparina sódica) y se debe homogeneizar sutilmente con el objeto de que la muestra se mezcle con este. El EDTA es el anticoagulante de elección para realizar análisis hematológicos, ya que permite la evaluación morfológica de las células sanguíneas, valoración de hematocrito.

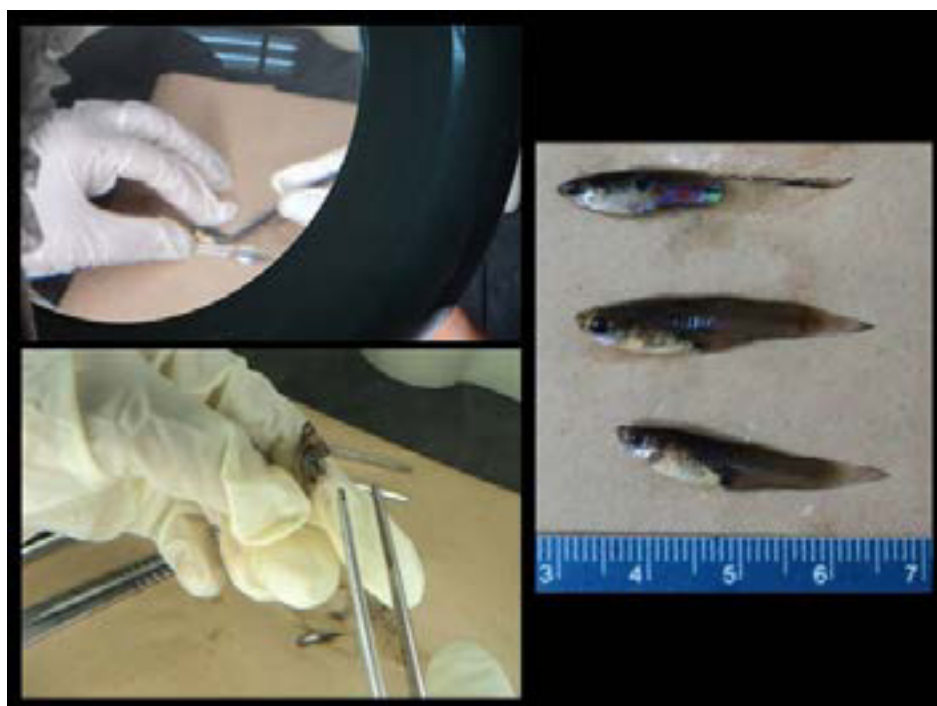


Figura 5.- Técnicas de necropsia en peces. (Fuente: Departamento de Patología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Diplomado Patología en Animales de Experimentación, Julio-Octubre, 2017).

Muestras para exámenes bacteriológicos: deben ser colectadas en condiciones de asepsia, empleando capsulas de Petriestériles, medios de transporte Stuart, empleando jeringas en caso de efusiones (contenido gastrointestinal, orina y algún tipo de efusión). Considerar en la historia clínica y anamnesis si el animal recibió tratamiento quimioterapéutico previo, ya que puede interferir con los resultados obtenidos. Es importante utilizar instrumental y recipientes estériles, así como evitar contaminación con exudados o contenido gastrointestinal, las muestras que no serán procesadas de inmediatamente deben refrigerarse a 4 °C.

Muestras para exámenes virológicos: El diagnóstico para enfermedades virales en términos generales puede requerir de suero, exudados, epitelios y de tejidos para llevar a cabo pruebas inmunológicas, de biología molecular, aislamiento de virus y estudios de ultraestructura, como técnicas de microscopia electrónica de transmisión. Las muestras deben ser frescas tomadas con precauciones de asepsias, de preferencia durante el periodo agudo de la enfermedad y no deben añadirse fijadores o antisépticos, estas se pueden enviar refrigeradas en congelación, además se puede añadir un medio de conservación, como secreciones o solución estéril de Hank y es preferible tomar 2 muestras de los mismos animales (sueros pareados), durante el periodo agudo del brote y tres semanas después. **Muestras para exámenes parasitológicos:** Se pueden recolectar muestras coprológicas, para la búsqueda de huevos o larvas, o colectar los parásitos tanto externos como internos durante el procedimiento de necropsia, los cuales pueden ser conservados en Alcohol al 70%, para su posterior identificación, además pueden tomarse muestras de intestino delgado y grueso para evidenciar la presencia de coccidias o tomar muestras de piel y raspados cutáneos, para observar parásitos externos.

Muestras para exámenes histopatológicos: Los tejidos deben recolectarse lo más pronto posible después de la muerte y de preferencia deben contener una parte de tejido afectado junto con otra de tejido normal. El grosor de la muestra depende del tejido pero como regla general no debe ser mayor a 0,5 cm y debe ser colocado en un frasco que contenga por lo menos diez veces su volumen de fijador, el cual para exámenes de rutina puede ser formalina al 10%, otros fijadores pueden ser

empleados como el Davidson's o el Bouin. Muestras para estudio toxicológico: Los tejidos, órganos, fluidos y efusiones para estudio toxicológico deben considerar una muestra mínima de 50 g. En muchos casos se recomienda tomar muestras de ambiente, alimentos y agua.

Muestras para estudios moleculares: Para realizar biología molecular es necesaria la toma de muestras o tejidos fijados en etanol al 100%, esto permite la detección de ADN de algún posible agente patógeno.

DISCUSIÓN

La recopilación de datos al final de un estudio puede requerir un examen post mortem de los animales¹⁰. La necropsia es un paso importante en la mayoría de los estudios que utilizan animales de laboratorio, durante la necropsia, se pueden registrar cambios tisulares y de órganos notoriamente graves, y se pueden almacenar muestras de tejido importantes para su evaluación posterior¹¹.

La necropsia es un procedimiento indispensable en las unidades de bioterio, cada patólogo veterinario puede tener predilección por una técnica específica, es aconsejable que, como regla general, trabaje siguiendo una rutina sistemática establecida. La necropsia es uno de los principales métodos de estudio de la Anatomía Patológica, ya que tiene como objetivo principal determinar las causas de muerte o la enfermedad fundamental que tuvo que ver con este proceso, mediante la visualización macroscópica de órganos y sistemas obteniendo muestras de estos elementos y realizando numerosas técnicas histológicas para analizar su estructura microscópica¹².

Estos procedimientos están diseñados principalmente para optimizar la necropsia y la recolección de muestras para la vigilancia de enfermedades infecciosas, pero la mayoría son enfocadas a las investigaciones de incidentes o brotes de enfermedad sospechosos en los que tal vez solo un subconjunto de los procedimientos sería empleado. Muchos de los procedimientos también son relevantes para las necropsias más comúnmente realizadas al final de los estudios de investigación como parte de una evaluación morfológica general junto con la recolección de muestras específicas del estudio para el análisis posterior.

La historia clínica, el examen macroscópico durante el procedimiento de necropsia sugieren al patólogo veterinario las posibles muestras recolectar, el método de fijación y transporte, así como el laboratorio donde serán remitidas. Los animales de experimentación incluyen una serie de especies con algunas diferencias anatómicas, que deben ser consideradas durante el procedimiento de necropsia, por lo tanto, la capacitación y actualización es fundamental.

Toda la información obtenida debe ser debidamente registrada en un protocolo previamente establecido, el cual nos ayudara a ordenar la información de manera práctica y específica. El diagnóstico de las causas de enfermedad o muerte que afectan a las diferentes especies animales de experimentación es de fundamental importancia para la aplicación rápida de medidas terapéuticas y de control en un bioterio.

Es necesaria la capacitación del personal que labora en los bioterios para la aplicación de la técnica de necropsia básica bajo supervisión, con fines de preservar un material de gran valor diagnóstico en un momento determinado antes que descartar un animal que ponga en riesgo al resto de la colonia.

En este artículo se describieron las técnicas de necropsia y toma de muestras en animales de experimentación con énfasis en cobayos (*Cavia porcellus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), ratones (*Mus musculus*), la rata (*Rattus norvegicus*, variedad albina), incluyendo peces, como una herramienta básica para el diagnóstico de patologías en animales de experimentación así como se mencionaron las condiciones de envío de muestras a los distintos laboratorios.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores expresan su agradecimiento a la Gerencia Sectorial de Producción y Servicios Básicos y a la Gerencia de Docencia e Investigación del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel por el financiamiento (Punto de Cuenta 25/2017), Diplomado en Patología de Animales de Experimentación.

REFERENCIAS

1. Morales Briceño A, Lamprea Garrido A, García Hermoso A, Méndez Sánchez, A. La necropsia en campo: Un servicio agregado en la medicina veterinaria rural. RevMedVet. 2017;(34 Supl):167-180.

2. Gázquez A. La necropsia en los mamíferos domésticos. Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 1988. p. 190.

3. Boada M, Colon A, Castellón N. La experimentación animal; 2011. 1-40.

4. De Jesús R. Bioética Animal en Venezuela. Revista de la Facultad de Farmacia. 2002; 43:43-46.

5. Ley para la Protección de la Fauna Doméstica Libre y en Cautiverio (Gaceta Oficial N° 39.338 del 4 de enero de 2010).

6. NIBIOHN. <https://www.nibiohn.go.jp/english/part/bioresources/detail3.html>. (Revisada 13/11/2017).

7. Feldman D, Seely J. Necropsy Guide: Rodents and rabbit. CRC Press; 1988. p.25.

8. Aluja A, Constantino F. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2 ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2002. p. 176.

9. Astaiza J, Benavides J, Chaves C, Arciniegas A, Quiroz L. Estandarización de la técnica de necropsia en cuyes (*Cavia porcellus*) en la Universidad de Nariño. Investigpecu. 2013; 2 (2): 77-83.

10. Parkinson CM, O'Brien A, Albers TM, Simon MA, Clifford CB, Pritchett-Corning KR. Diagnostic Necropsy and Selected Tissue and Sample Collection in Rats and Mice. J. Vis. Exp. 2011; (54): e2966.

11. Fiette L, Slaoui M. Necropsy and sampling procedures in rodents. Methods Mol Biol. 2011; 691: 39-67.

12. Avila R, Samar M, Camps D, Recuero Y. La autopsia en animales de experimentación: Un instrumento en el proceso de enseñanza/aprendizaje en la carrera de medicina. REA: EJ Autopsy 2007, 1-3.

Recibido: 15 de noviembre de 2017

Aprobado: 03 de abril de 2018.