

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES

ESCUELA DE PSICOLOGIA

**EVALUACIÓN BIOCONDUCTUAL EXPERIMENTAL, EN RATAS, DEL EFECTO
ANALGÉSICO Y ANSIOLÍTICO DE UN EXTRACTO DE PLANTA DE CANNABIS
CULTIVADA EN COSTA RICA**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN PSICOLOGIA

Proponente:

Jonatán Pérez Rocha

Comité Asesor:

Director: MSc. Miguel Márquez Cueva

Lectora: Dra. Sandra Badilla Chávez

Lectora: Dra. Mercedes Arévalo Aguillón

Año: 2013

RESUMEN EJECUTIVO

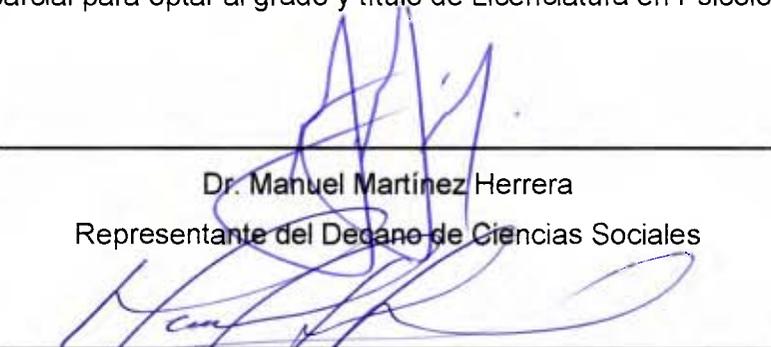
El presente estudio evalúa a la luz de la psicología comparada, las propiedades analgésicas y ansiolíticas de un extracto de planta completa de *cannabis sp*, elaborado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica. Se utilizaron dos instrumentos bioconductuales: el tail flick y el laberinto elevado en cruz o plus maze.

Como parte de una fase preclínica se les administró por vía oral, diferentes dosis del extracto a sujetos no humanos de experimentación de la especie *Rattus norvegicus*, de la cepa (Hsd): Sprague Dawley.

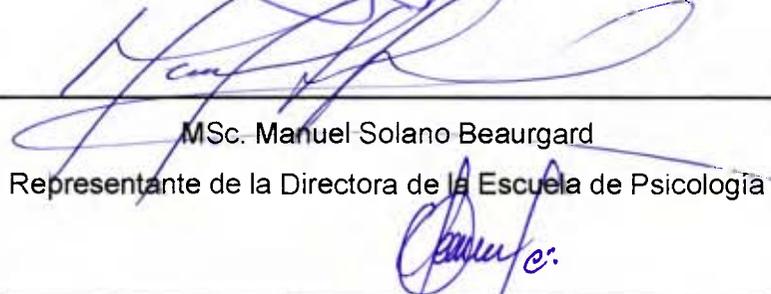
Se justifica dicho estudio teniendo en cuenta que la planta de cannabis debido a variantes epigenéticas, microambientales y debidas a la hibridación natural de las diferentes subvariedades, cambia adaptativamente las concentraciones de su matriz herbácea de un zona geográfica a otra. Por otro lado, respetando los postulados de la etnomedicina, la etnobotánica y ciertas visiones enteogénicas, se utilizó para este estudio toda la matriz herbácea y no sus fracciones como se viene haciendo desde hace un par de décadas.

Se estructuró este estudio en base a un diseño estadístico de bloques, y se midieron ciertas variables cuantitativas continuas y discretas, datos a los que entre otros estadísticos se les hizo un análisis de ANOVA para evaluar en tres diferentes dosis el efecto analgésico y el efecto ansiolítico de este extracto de planta completa de cannabis.

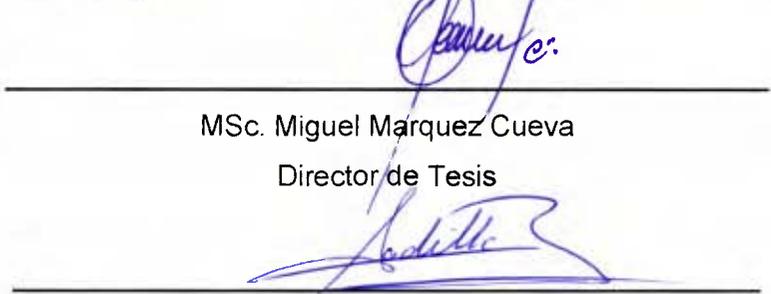
Esta tesis fue aceptada con distinción de honor, por el Tribunal Examinador designado para ésta ocasión, por la Dirección de la Escuela de Psicología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Licenciatura en Psicología.



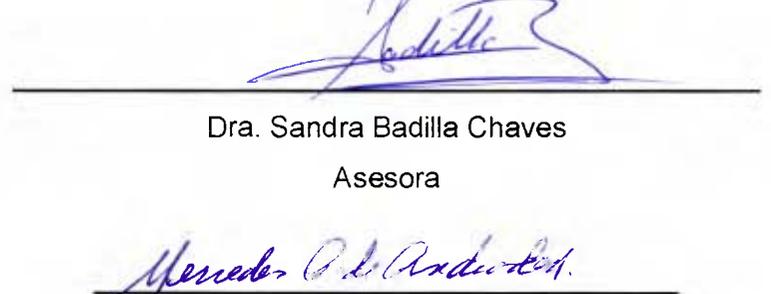
Dr. Manuel Martínez Herrera
Representante del Decano de Ciencias Sociales



MSc. Manuel Solano Beaugard
Representante de la Directora de la Escuela de Psicología



MSc. Miguel Marquez Cueva
Director de Tesis



Dra. Sandra Badilla Chaves
Asesora



Dra. Mercedes Arévalo Aguillón
Asesora



Jonathan Pérez Rocha
Candidato

EN MEMORIA AL DR. CARLOS MANUEL QUIRCE BALMA



Pionero de la psicología experimental y comparada en Costa Rica, maestro de innumerables académicos, autodidactas, profesionales y versados en las diferentes artes del quehacer filosófico, quien marco un hito en la investigación científica y que supo transmitir en nosotros, las futuras generaciones. Sea esta memoria uno más de los tantos reconocimientos a su labor docente e investigativa. Que Dios lo tenga en gracia...

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a todos los sujetos no humanos de experimentación que han hecho posible gracias al sacrificio que hacemos de sus vidas, la esperanza de una mejor calidad de vida para los animales humanos. Espero que el mundo de hoy y el venidero sepa agradecerles con vehemencia y genuflexión todo aquello que tomamos como obsequio, aunque les fuese arrebatado...sus vidas.

Dedico a esos seres, que ni cuenta dan de ello, ni de estos escritos, para que quien tenga ojos, lea y no les mire con desdén, si no, más bien con respeto, con agradecimiento y cuando de aspectos nimios se trate su sacrificio, sintiéndose con cortedad, pues mucho de cuanto disfrutamos hoy en día, desde aspectos relacionados a la salud humana, la ciencia y hasta aquellos tan banales como la cosmética, aún emplean animales.

AGRADECIMIENTOS.

Sin duda alguna, una investigación cualquiera que sea el tema que se aborde, requiere de una visión tanto multiparadigmática como interdisciplinaria, es por ello que en primera instancia debo agradecerle al equipo asesor, mi director de tesis, el Psicólogo MSc. Miguel Márquez Cueva, director de este proyecto de investigación, que me impulso con paciencia y dedicación hasta la consecución final del mismo, muchas gracias por estar a mi lado y por el estoicismo con que guió de forma acertada dicho proyecto, pero además por tenderme con humildad y sabiduría una mano compañera en dicho proyecto.

A la Doctora en Farmacia Mercedes Arévalo Aguillón, quien con la sabiduría de los años supo impregnar juiciosamente las bases de una psicofarmacología herbolaria.

Con especial cariño, a mi maestra y amiga, la Doctora en Farmacia MSc. Sandra Badilla Chaves, quien como una madre que acoge a sus pupilos, me ha admitido en su círculo de seres queridos, a ella, quien con su guía, a sabido siempre alentarme a seguir adelante por esta senda de conocimiento y ser un ejemplo de un buen profesional.

He de agradecer profusamente además a la PhD. Sara Gonzales Camacho, quien fue mi acompañante en las noches en que se realizaron los ensayos, maestra además en el manejo de los animales y en la lectura e interpretación de datos, muchas gracias maestra.

Agradezco a mi familia en general, gracias Berna, Misael, Gladys y a mis sobrinos.

Gracias además a los estadísticos Ana Teresa Garita e Ignacio Sáenz, quienes me ayudaron con el análisis estadístico de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	- 1 -
JUSTIFICACIÓN	- 4 -
MARCO DE REFERENCIA.....	- 8 -
A. ANTECEDENTES	- 8 -
B. MARCO CONCEPTUAL.....	- 13 -
1. MARIHUANA.....	- 13 -
2. EXTRACTOS DE PLANTA DE CANNABIS	- 15 -
3. UN ABORDAJE DESDE LA PSICOLOGÍA.....	- 17 -
4. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN EN PSICOLOGÍA COMPARADA Y PSICOFARMACOLOGÍA.....	- 20 -
C. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	- 28 -
D. OBJETIVOS	- 31 -
1. OBJETIVO GENERAL:	- 31 -
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	- 31 -
3. OBJETIVOS METODOLÓGICOS:	- 32 -
METODOLOGÍA	- 33 -
A. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	- 33 -
B. HIPÓTESIS OPERACIONALIZADAS E HIPÓTESIS ESTADÍSTICAS	- 35 -
1. HIPÓTESIS INVESTIGATIVA (H ₁):	- 35 -
2. HIPÓTESIS NULA (H ₀):	- 35 -
3. HIPÓTESIS ESTADÍSTICAS:.....	- 35 -
C. DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA SELECCIONAR A LOS SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN.	- 37 -
D. DEFINICIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS.....	- 37 -
E. MATERIALES Y MÉTODOS	- 41 -
F. DEFINICIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS Y LAS TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS	- 42 -
G. DEFINICIÓN DE VARIABLES	- 43 -
H. CRITERIOS PARA GARANTIZAR LA CALIDAD DE LA INFORMACIÓN	- 50 -
I. PRECAUCIONES Y PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES	- 51 -
PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	- 53 -
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	- 56 -
A. SOBRE LA DOSIS LETAL DEL EXTRACTO DE MARIHUANA	- 56 -
B. SOBRE LAS RESPUESTAS CONDUCTUALES ASOCIADAS A ANALGESIA	- 58 -
C. SOBRE LAS RESPUESTAS CONDUCTUALES HOMÓLOGAS A ESTRÉS Y ANSIEDAD	- 59 -
CONCLUSIONES.....	- 62 -
REFERENCIAS.....	- 67 -
ANEXOS.....	- 78 -
DATOS OBTENIDOS	- 83 -
PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN	- 86 -
TAMIZAJE EN FARMACOLOGÍA CONDUCTUAL.....	- 87 -
FORMULARIO DE REGISTRO PARA UTILIZACIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO	- 90 -
PROTECCIÓN A ANIMALES	- 113 -

INTRODUCCIÓN

Las propiedades curativas, entre otros usos de las plantas, se emplearon para aliviar los padecimientos de los seres humanos desde tiempos antiguos. El conocimiento práctico acerca de las plantas y sus efectos curativos se acumularon desde la antigüedad y pasó a ser parte integral de sistemas y tradiciones curativos de algunas sociedades tales como: el Ayurveda en la India, la medicina tradicional china o las tradiciones curativas entre los indígenas americanos, como los: quetchuas, los chibchas y las grandes civilizaciones: Inca, Maya, y Azteca. Bayes (1997).

En pleno siglo XXI, algunos ámbitos de cultura popular conservan creencias místicas sobre las plantas, en donde es común escuchar que las plantas son benignas o malignas, que sirven sólo en una dirección, como cura o como veneno. No obstante la ciencia y los ámbitos académicos han ido eliminando el velo místico con que se cubría a las plantas malignas, tóxicas y muchas veces señaladas como únicas y verdaderas culpables de los vicios, la adicción y la perversión humana. Escohotado (1999).

En la actualidad, la ciencia busca descubrir nuevos fármacos a partir de las propiedades curativas de las plantas y recientemente vemos cada vez más estudios de tipo neurofisiológicos, farmacológicos y psicológicos; en esta última línea sobresalen los de tipo conductual, como los llevados a cabo por Berrendero y Maldonado (2002), sobre el efecto ansiolítico inducido por Δ^9 -tetrahydrocannabinol, o la investigación de los efectos sobre la subjetividad humana que la marihuana genera cuando es absorbida por tracto digestivo al ser fumada, realizado por Wachtel, ElSohly, Ross y Ambre (2002), o estudios de los efectos agudos de tetrahydrocannabinol en el umbral auditivo en sujetos humanos, por Mulheran, Middleton y Henry (2002).

Investigadores alrededor del mundo, (Berrendero y Maldonado 2002; Wachtel, ElSohly, Ross y Ambre 2002; Mulheran, Middleton y Henry 2002), estudian la planta de cannabis, sus derivados sintéticos y la función del sistema cannabinoide endógeno, entendiendo que los modelos experimentales por sí mismos, en general no contribuyen a detener su consumo ilegal, sin embargo realizan contribuciones que adosan información al ‘estado de la cuestión’, como apuntaría Subizarreta (1998), cuando se habla de un fenómeno y en este caso particular, el conjunto de efectos que hacen de la marihuana, la droga de consumo ilegal más consumida mundialmente, según reporta la ONUUD (2012).

Gran parte de las investigaciones en cannabinoides (cannabis), se han desarrollado en contextos diferentes al de Costa Rica; en nuestro país, son pocos los estudios reconocidos que abordan de manera directa y científica a la planta de cannabis y las investigaciones existentes apuntan a sus consumidores y abordan de manera tangencial el producto que consumen, por lo que no existen registros de estudios dentro del área de psicología comparada o dentro de la psicología experimental.

El estudio de las plantas y sus efectos sobre la conducta ha sido ampliamente abordado por diversas áreas, debido a que existen similitudes fisiológicas entre mamíferos de otras especies y el hombre; investigaciones sobre dichas semejanzas permiten avances en etología, en psicofarmacología y en psicología comparada con un alto grado de predictibilidad. Ardila (1965).

En este estudio, se abordó el estudio de la marihuana basándose en registros conductuales de sus efectos, en donde un extracto de la planta se administró vía oral a sujetos no humanos de experimentación, específicamente en ratas blancas de la cepa

Sprague dawley, con el fin de conocer dos posibles propiedades: analgésica y ansiolítica. Los resultados pretenden establecer si es la posible justificar nuevos estudios que continúen la búsqueda de las posibles alternativas fármaco-terapéuticas que ofrece esta planta.

Esto a futuro podría permitir un cambio en el uso de las especies y las variedades de las plantas de cannabis incautadas, estas no solo tendrán una vía, su destrucción como tradicionalmente se hace, sino que se les podría dar un uso adecuado, científico y aplicados a campos inhabituales como la psicoterapia o los cuidados paliativos. Salas (2002).

Se plantea un acercamiento desde la psicología de corte experimental para evaluar el potencial analgésico y ansiolítico de un extracto de plantas de cannabis, a través de la aplicación de técnicas conductuales con el fin de estudiar las posibles propiedades del cannabis, dentro de un marco ético y comprobado científicamente. Para lo anterior, se pretende utilizar un extracto de esta planta psicoactiva, elaborado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica, con plantas de marihuana (nombre popular del cannabis) provenientes de una zona específica del país: la región Bribri, ubicada en Talamanca, Limón.

JUSTIFICACIÓN

La investigación implementa metodologías en psicología que datan desde antes de que Ramón Bayes, aplicara el término de farmacología conductual Greenwood (2011), Bayes, (1977); con el objetivo de evaluar el efecto de estos fármacos sobre la conducta; se hace uso de: modelos animales, métodos derivados de los paradigmas de psicología experimental Wuntiana, conducta refleja Pavloviana, aprendizaje operante Skinneriano. (Por ejemplo los efectos de los fármacos sobre la ansiedad condicionada, indefensión aprendida como modelo de la depresión, efecto de los fármacos sobre la tasa de aprendizaje, entre otros). En especial por las similitudes fisiológicas que presentan ciertos animales con el ser humano.

En humanos, el gen del receptor cerebral endocannabinoide se encuentra en la región q14-q15 del cromosoma 6, presentando una homología del 97,3% con el de rata. Bobes y Calafat, (2000).

La evaluación bioconductual del cannabis con técnicas de psicología experimental y la psicología comparada, ofrecen un aporte desde los modelos ‘*in vivo*’ al corpus teórico que recientemente se viene gestado sobre los cannabinoides, permitiendo un acercamiento a los procesos de investigación en psicología experimental, a la luz de un análisis propio de una ciencia social cuyos fines están orientados a la salud y el desarrollo del ser humano y de la sociedad en general.

Una de sus principales justificaciones, es ser el primer estudio de la marihuana que se realiza en Costa Rica desde el área de la psicología comparada, psicofarmacología y la psicología bioconductual experimental, teniendo en cuenta la relación que existe entre

inter-especies, conductas y cerebro en búsqueda de fármacos alternativos que mejoren la calidad de vida humana, uno de los ejes de la psicología.

Asimismo éste estudio sigue la línea indagatoria desarrollada mundialmente que ha tenido en los últimos años la investigación de los cannabinoides y sus propiedades, al creciente uso inadecuado e ilícito UNODC, (2004, 2010, 2012), así como la poca o casi nula cantidad de estudios en plantas que el área de la psicología, ya sea experimental, psicofarmacológica o desde la psicología comparada que se ha realizado en Costa Rica.

A pesar de ser un tema que sigue causando polémica a nivel mundial por tratarse de una droga ilegal, el estudio y la investigación de extractos de marihuana con fines científicos y medicinales podría ser una de las formas de combatir un flagelo social, mejorar la calidad de vida humana, fin último de la psicología, aprovechar las plantas de cannabis incautadas y re direccionar el uso de una de las drogas ilegales de mayor consumo en el mundo, según lo reporta la Organización de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito:

En el Informe Mundial sobre las Drogas del 2004, la ONUDD señala que casi 150 millones de personas en el planeta la usan, seguida por el consumo de anfetaminas. (ONUDD, 2004). Ha aumentado para 2010 en casi todos los países del mundo y la fuman entre 130 y 190 millones de personas al menos una vez por año (UNODC, 2009), y en el reporte del 2012, señala que las dos drogas ilícitas de mayor consumo siguen siendo el cannabis (prevalencia anual mundial entre el 2,6% y el 5,0%) y los estimulantes de tipo anfetamínico, excluido el “éxtasis” (0,3% a 1,2%).UNODC, (2012).

Cabe mencionar que la realidad Costarricense no se aleja de las estadísticas mundiales, de acuerdo con la Encuesta Nacional 2009, en población de secundaria realizada por el Instituto sobre Alcoholismo y Farmacodependencia (IAFA), el cannabis es una de las drogas ilícitas de mayor consumo, seguida por la cocaína. Bejarano y Ugalde, (2003). Entre las llamadas drogas ilícitas, es la que se consume en mayor medida, no sólo por estudiantes de colegio sino también por la población en general Bejarano, Fonseca y Sánchez, (2009). El consumo de cannabis para el 2000 tenía una prevalencia de vida de 5,5 y una prevalencia anual de 1,3; reporta además dicha institución que:

La incidencia anual de consumo de marihuana en el 2000 fue de 8,5 individuos por cada mil habitantes entre las edades de 12 a 70 años, siendo la edad de inicio promedio a los 17 años... Bejarano y Ugalde, (2003).

En 1995, la incidencia anual reportada por el IAFA era de 1,06 por cada mil, por lo que es claro que la incidencia anual de consumo de cannabis en Costa Rica ha sufrido un aumento considerable en 5 años. Bejarano y Ugalde, (2003). Casi quince años después, en el 2009, reportan los investigadores que el 6,82%, es decir 22.400 individuos de la muestra encuestada, apreciándose un incremento considerable en el consumo de marihuana. Los hombres en los doce meses anteriores a la investigación obtuvieron un porcentaje de consumo superior al de las mujeres. El porcentaje de consumo en hombres, el último año según la Encuesta Nacional sobre consumo de drogas en población de educación secundaria fue de 9,2% contra un 4,6% de las mujeres. Los consumidores activos de marihuana indicaron edades de inicio cuyo promedio fue de 13,71 años cumplidos. Bejarano, Fonseca y Sánchez, (2009).

Los efectos conductuales y emocionales buscados por los consumidores, las alteraciones bioquímicas asociadas a modificaciones de conducta por efecto de los ingredientes psicoactivos de los extractos de planta completa de las diferentes variedades de cannabis, requieren de estudios cada vez más exhaustivos y específicos de las diferentes áreas de la psicología, además de estudios interdisciplinarios.

En Costa Rica por ejemplo, Salas (2002) ha realizado estudios sobre el potencial terapéutico del cannabis en pacientes con problemas neurodegenerativos y en pacientes con dolor agudo, comprobando como los derivados de esta planta pueden brindar un apoyo a los servicios de cuidados paliativos en Clínicas del Dolor.

Además, se indaga la acción antiinflamatoria de los endocannabinoides en ratas, publicaciones realizadas por Conti, Costa, Colleoni, Parolaro, Giagnoni (2002), Wu y Rodriguez (2007); estudios en animales sobre los cannabinoides y su papel en los procesos de memoria, por Castellano, Rossi-Arnaud, Cestari y Costanzi (2003), o los realizados por Pertwee (2002), en los que registra nuevos receptores para cannabinoides; entre otros estudios que responden a la necesidad de indagar más acerca de la droga ilegal más consumida mundialmente.

MARCO DE REFERENCIA

A. ANTECEDENTES

En Costa Rica, el ejercicio de la psicología es relativamente nuevo, inicia con la visita en nuestro país en 1936 de un grupo de psicólogos chilenos que dan a conocer la importancia de la disciplina psicológica en los procesos de enseñanza aprendizaje y educación, Jensen (1995); en los años 50 e inicio de los 60 regresan al país una serie de profesionales que habían realizado sus estudios en higiene mental, orientación y en psicología; con doctores como Mariano Coronado, Gonzalo Adis, Edgar González, entre otros. Claudet (1970).

Ya para el año 1960, se forma el centro de investigaciones psicológicas que posteriormente se va a convertir en el instituto de investigaciones psicológicas, como se le conoce hoy. Campos, (1986), Cordero y Salas, (2000).

En los años setenta Carter, Coggins y Doughty (1976) iniciaron estudios en Costa Rica sobre la marihuana y publicaron un libro basado en los estudios llevados a cabo en el país con consumidores crónicos de puros de marihuana. Posteriormente Page y Fletcher (1991), retomaron este estudio y publicaron el resultado de sus hallazgos, cuyo análisis contaba con un mayor número de detalles sobre los efectos psicosociales de los consumidores, enfatizando los problemas que tenían los sujetos del estudio, derivados a raíz del consumo excesivo de marihuana.

Los sujetos, una muestra ubicada dentro de la periferia de San José, eran participantes voluntarios y consumidores crónicos. Ellos conseguían las dosis por sus propios medios y la consumían fumando los puros que elaboraban; el promedio de consumo estaba en 15 puros diarios. Esta investigación rescata los conocidos efectos

de la marihuana cuando se consume de forma crónica y describe lo que Martínez et al. (2002), denominaron posteriormente como los signos de un posible síndrome de abstinencia al cannabis.

Además se destacan investigaciones que relacionan dolor con receptores cannabinoides, como la de Isaías Salas. Los sujetos de la investigación de Salas (2002), en su mayoría, fueron escogidos por ser pacientes diagnosticados con Esclerosis Múltiple, con edades entre los 18 y los 70 años, atendidos en los hospitales de Costa Rica, Panamá, Honduras y Guatemala. Entre los resultados obtenidos, se informa que hubo progresos en la espasticidad muscular, asimismo los pacientes manifestaron una disminución de los síntomas dolorosos:

En busca de un análisis objetivo, del efecto de agentes sintéticos de la marihuana como droga paliativa contra el dolor, se realizó ésta investigación acerca de los derivados cannabinólicos (entre ellos el dronabinol), en pacientes atendidos en los servicios de Neurología de los principales hospitales de Centroamérica: Costa Rica, Panamá, Honduras y Guatemala. Salas (2002).

No obstante, el autor afirma que el campo del manejo del dolor con derivados de cannabis requiere más estudio, con el objeto de entender cómo actúan en el cerebro algunos de los principales componentes de esta droga y así, minimizar los efectos indeseados que estos puedan producir.

Dentro de las tesis de licenciatura que han abordado el tema del cannabis, destaca la realizada por Corella (1994), que aborda el tema del cultivo y

comercialización de la marihuana en Costa Rica, bajo el título de “Agricultura ilícita en Costa Rica”, en el que trata el tema del derecho procesal penal. Otra, realizada por Jiménez, Lizano, Morales y Solera (1982) un estudio de casos, el cual profundiza en las características de personalidad del adolescente consumidor de marihuana, desde la óptica de la psicología de las adicciones y los patrones de conducta adictiva.

También es preciso señalar el trabajo realizado por Rodríguez y Wu (2007), en su tesis de licenciatura el cual busca determinar la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva y fagocítica de fracciones de *Cannabis sativa*, en la que concluyen:

Que extractos metanólicos de C. sativa provenientes de la región de Osa y Bribri parecen tener actividad central que se manifiesta como sedación y aumento del apetito. Además la actividad antiinflamatoria e inmunosupresora no son dependientes de la dosis, debido a que un aumento de la cantidad y dosis administradas no produjeron variaciones significativas y su efecto fue máximo a 2 horas posteriores a su aplicación, reduciendo la actividad fagocítica de los macrófagos de ratón, al igual que actividad antinociceptiva periférica. Rodríguez y Wu (2007).

De lo anterior se puede destacar que los extractos estudiados por Rodríguez y Wu (2007), presentan analgesia periférica (actividad antinociceptiva periférica), lo cual hace más interesante investigar si extractos de cannabis presentan también actividad analgésica mediando conductas reguladas en sistema nervioso central.

Los primeros estudios se han centrado en caracterizar y clasificar las plantas de cannabis que existen en Costa Rica y recolectar información sobre aquellas plantas a las que la cultura popular les atribuye propiedades benéficas o malignas, dependiendo de su uso, y el análisis de su potencial como fármacos naturales.

Respecto a la psicología experimental, en Costa Rica, no hay registros de estudios llevados a cabo con extractos de una planta completa de cannabis. Esto se debe a que en su mayoría, el registro, evaluación y análisis de las plantas, en búsqueda de propiedades que pueda ser aprovechada por la humanidad, ya sea con fines: medicinales o industriales, es un tema relativamente nuevo, que inicia experimentos en plantas a partir de la década de los ochentas, esfuerzos estimulados por instituciones como la Universidad de Costa Rica, la Universidad Nacional, el Instituto Tecnológico de Costa Rica, y en menor grado el Instituto de Biodiversidad.

Éste potencial medicinal y tóxico (efectos adversos) de las plantas, ha sido ampliamente discutido en la Universidad de Costa Rica, en disciplinas como la farmacología, la etnobotánica, la fitofarmacología, la etnomedicina, y la psicología, dentro de sus paradigmas de psicología comparada, psicofarmacología y psicología experimental de la conducta, estudiando las propiedades energéticas y curativas de las plantas (terapia floral, esencias, aceites, bálsamos e infusiones).

Las áreas de la psicología comparada y bioconductual experimental han tenido auge desde 1977, con los estudios pioneros realizados por Quirce, Odio y Solano (1977), que investigaban los correlatos bioquímicos y fisiológicos del stress anticipable incondicionado a intervalos fijos.

A partir de 1977, el desarrollo de estudios con modelos bioconductuales tuvo apogeo en la Universidad de Costa Rica. Esto se vio reflejado en los temas de tesis de los años posteriores; por citar algunos ejemplos: se investigó el efecto de un sistema de desnutrición durante el periodo de gestación sobre parámetros conductuales producto de la implantación de un horario de reforzamiento en ratas blancas, estudio realizado por Olmos (1988). Al año siguiente se estudió los efectos de la restricción proteica - calórica gestacional en el condicionamiento operante de ratas adultas, mediante horarios de reforzamiento. Fornaguera, (1989).

En 1992, Vargas analizó con modelos bioconductuales el efecto de diferentes agentes anorexígenos sobre la conducta exploratoria libre y los niveles sanguíneos de ácidos grasos y glucosa libre en ratas. Un año después, Muñoz estudió a través de modelos animales el efecto de un sistema de desnutrición durante la lactancia sobre el aprendizaje. Muñoz, (1993).

Actualmente en la Universidad de Costa Rica, el Centro de Investigación en Neurociencias en conjunto con el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR) de la Facultad de Farmacia, la Facultad de Medicina y el Laboratorio de Ensayos Biológicos, estudian las propiedades de extractos de plantas para el posible uso terapéutico y los efectos de las plantas sobre ciertos neurotransmisores.

El Centro de Investigación en Neurociencias nacido como Programa de Investigación en Neurociencias desde el año 2001 ha llevado a cabo investigaciones en farmacología, medicina, fitoterapia, con modelos bioconductuales, tras la pista de propiedades farmacológicas y medicinales de plantas, entre otras investigaciones. De

igual manera, la Escuela de Psicología en conjunto con la Facultad de Farmacia trabajaron en el Programa de Herbología, coordinado por el Dr. Quirce Balma, con el fin de buscar alternativas terapéuticas a enfermedades mentales, emocionales y psicosomáticas, así como plantas con propiedades psicoactivas aprovechables en el área de la salud.

Los resultados que arroje esta investigación, también permitirán la actualización de datos al proyecto “Propiedades de la marihuana”, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, en el Acta # 32, proyecto #12 iniciado el año 2002, el cual se lleva a estudio el potencial inmunomodulatorio, inmunoinflamatorio de la marihuana, así como su potencial analgésico y ansiolítico a través de modelos bioconductuales.

B. MARCO CONCEPTUAL

1. *Marihuana*

La marihuana utilizada tiene como nombre científico *Cannabis sativa* y es una planta dioica, es decir con sexo separado. A veces, cuando se encuentra en condiciones desfavorables, la misma planta contiene flores masculinas y femeninas y puede revertir su sexo después de haber sido trasplantada.

Es una planta anual perteneciente al género de las moráceas, pero que, en algunas ocasiones, junto con el lúpulo se la ha considerado como de la familia de las cannabáceas. Está ampliamente distribuida por las regiones templadas y

tropicales del planeta. Se han descrito más de cien variedades diferentes. Baily (2000), citado por Bobes y Calafat en Monografía Cannabis: (2000).

Algunas de sus subespecies reciben el nombre de índica o americana, como identificación de la localización geográfica de su crecimiento. Sin embargo, aunque en algunos trabajos este adjetivo aparece asociado al mayor o menor contenido en sustancias psicoactivas, en la realidad no describe ninguna de las características básicas de la planta.

La planta, que inicialmente se utilizó en su forma silvestre, es en la actualidad cultivada para aumentar su producción de resinas y de tetrahidrocanabinol (THC), su principal sustancia activa; en ciertos países esta despenalizado su consumo, (no su tráfico), siendo el caso más conocido Holanda, donde el consumo y la compra de cannabis y sus derivados están permitidos en pequeñas cantidades a través de los coffee-shops, otros ejemplos, son Italia, Suiza, Alemania, Bélgica, España, Portugal y Uruguay.

La adaptación suele venir acompañada por variaciones morfológicas, principalmente en las hojas. Las principales modificaciones observadas en los diferentes tipos de plantas son debidas a una cierta plasticidad genética, a las influencias del entorno (especialmente temperatura y exposición a la luz) y a la manipulación humana (para obtener híbridos). Sin embargo, sin que se mejore por hibridación, una planta importada de la India muestra después de varias generaciones propiedades y características muy similares a las europeas, por otra parte para la producción de fibra, tras ser plantada en áreas secas y calientes de

Egipto, tiende a producir después de varias generaciones plantas con alto contenido psicoactivo y sin apenas fibra. Atance, Fernández (1999), citado por Bobes y Calafat en *Monografía Cannabis: 2000*).

Un cannabinoide es un compuesto orgánico perteneciente al grupo de los terpenofenoles y que activa los receptores cannabinoides en el organismo humano, Lambert, Fowler (2005). Según la ONUDD (2004), en Centroamérica, la variedad más cultivada y/o utilizada en el comercio ilegal es la subespecie sativa-sativa, al parecer con menores concentraciones que la subespecie de *Cannabis indica*.

2. *Extractos de planta de cannabis*

Al decir esta investigación que se utiliza un extracto de planta de cannabis, hace referencia a una sustancia obtenida en un laboratorio a partir de esta planta, se aprovecharon las florecencias, las hojas y los brotes de la planta.

Se dice que el extracto es completo porque no se separan o fraccionan los principios activos del extracto: cannabinol, cannabidiol, los diferentes tetrahidrocannabinoles, alcaloides, resinas, aceites esenciales y toda la gama de sustancias que podrían fraccionarse de estas partes de la planta para obtención de sustancias con los diferentes principios activos que se encuentran ahí, eso hace que sea un extracto completo de las partes utilizadas de la planta. Bisset (1994), Bruneton, (2001).

Los aceites esenciales constituyen la fracción volátil de los principios activos contenidos en una planta, y por tanto, se obtienen mediante técnicas de

destilación, en la que se volatilizan estos principios por calor, se condensan en frío y se recogen, mientras que los extractos consisten en la fracción no volátil de los principios activos, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante extracción por solución precisando una mayor inversión que la extracción por arrastre de vapor pero, genera un rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, además de obtenerse «prácticamente todos» los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, entre otros. El uso de equipos de vacío para poder obtener los aceites absolutos y sobre todo, necesarios los disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, entre otros. Palomino (2001).

Para obtener el extracto se lleva a cabo una mezcla de la planta secada sin luz directa y picada, con disolventes orgánicos que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura.

Después, se elimina el disolvente, obteniendo el extracto deseado. La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación, no soluble en agua, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites. Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30°C a 70°C, se evapora fácilmente y es inflamable, benceno, que disuelve también ceras

y pigmentos, y los disolventes en base a alcoholes, Secretaria de Salud de México (2009). Este método fue el utilizado para la elaboración del extracto evaluado en esta investigación y que es soluble en agua.

Una vez elaborado el extracto de planta de cannabis, se realizan las pruebas a la luz de la psicología comparada, la psicobiología, la psicología bioconductual experimental, ramas de la psicología estructural propuesta por William James, disciplinas científicas que consideran que los fenómenos psicológicos no solo tienen un sustrato biológico, sino que además pueden ser estudiados por medio del método experimental, de la misma forma que en su tiempo lo hicieron Wilhem Wundt, Max Friedrich y Stanley Hall, fundadores de la psicología académica y experimental. Greenwood (2011).

3. *Un abordaje desde la psicología*

La psicología funcionalista y la estructural involucran en sus procesos la observación, manipulación y registro de las variables que afectan un objeto (sujeto) de estudio y en donde es posible describir y explicar dichas variables en relación con el comportamiento, la conducta y los procesos psicológicos a través de metodologías propias de modelos bioconductuales experimentales, modelos psicofarmacológicos, modelos en psicología comparada y psicología conductual experimental. Gutiérrez (2003).

El estudio de los procesos psicológicos en animales, sea que los comparemos con los procesos psicológicos del hombre o no, tiene una historia corta. A veces se encuentra citado como psicología comparada, a veces como

etología, conducta animal, psicología animal, o bien zoopsicología. Tiene importante relación con la historia de la evolución de las especies, al darwinismo y al desarrollo de la psicología como ciencia. Se ha afirmado que si no fuera por el darwinismo no se habría propuesto nunca una psicología animal, Greenwood (2011).

Este abordaje experimental de la psicología, con el tiempo ha ido afirmándose como relevante para el comportamiento humano, y no solo una teoría, que sería absorbida en el futuro por la sociobiología. Wilson (1975).

Este paradigma viene desarrollándose en diversas regiones del mundo, ante todo por psicofisiólogos que han ayudado a definir los alcances y limitaciones en países como Inglaterra, Estados Unidos, Francia, Alemania, Japón y la URSS, pero con importantes contribuciones procedentes de otras partes del mundo. Es una ciencia que está aquí para permanecer y que los científicos de esta área de la psicología experimental, prefieren llamar psicología comparada y no una de las otras denominaciones. Además no todas esas denominaciones son estrictamente equivalentes debido a que enfatizan aspectos diferentes, aunque todas se refieran en justicia a lo mismo: el estudio de los procesos psicológicos en especies diferentes del hombre. Ardila (1986).

En la actualidad la psicología se ha vuelto muy antropocéntrica, parece haber dejado de lado que el ser humano, aunque con derivaciones neurológicas significativas, sigue siendo un animal que responde a una biología, a un ambiente al que llamamos cultura y a necesidades aunque muchas de ellas simbolizadas,

pero taxonómicamente hablando, se enmarcan dentro de la biología propia de un mamífero.

Los modelos bioconductuales experimentales de la psicología comparada, lejos de ser antropocéntricos vienen a homologar y establecer analogías como formas posibles de comparaciones, así lo expresan Mason y Lot (1976), cuando afirman que no hay motivos para suponer que cuando se opta por una aproximación analógica se esté asumiendo la existencia de mecanismos equivalentes; señalan estos autores la conveniencia de tener en cuenta siempre que las funciones similares no tienen por qué depender de mecanismos iguales incluso dentro de la misma especie y que conductas que parecen tener la misma función, pueden diferir en su relación con las variables fisiológicas, los estímulos evocadores o su historia de desarrollo, estas puntualizaciones nos ayudan a tener bien definido los alcances y limitaciones de esta y otras áreas de la psicología.

Teniendo en cuenta las aclaraciones de Mason y Lot (1976), al respecto de aproximaciones al estudio de la conducta a través de modelos experimentales animales y humanos se puede afirmar que:

...las comparaciones analógicas pueden utilizarse sin temor a incurrir en errores epistemológicos. Desde esta perspectiva, ambos tipos de aproximaciones pueden combinarse perfectamente en el estudio del comportamiento, siempre que se tenga delimitados el objetivo de la investigación y el nivel

de generalización de nuestros datos. Loeches, Gil-Burmann,
Pelaez del Hierro (1994).

4. *Modelos de experimentación en psicología comparada y Psicofarmacología*

Como reiteradamente se ha expuesto, esta es una investigación de corte bioconductual experimental dentro del marco de la psicología comparada.

Varios estudios con animales y humanos demuestran en un número importante de estudios aplicados en laboratorios bioconductuales han tenido como objetivo examinar la influencia de reforzadores alternativos de diferentes drogas sobre la preferencia y la elección de sustancias con propiedades psicoactivas en animales para así establecer homologías y poder explicar conductas adictivas en humanos. Los resultados de estudios como los de Bickel y Marsch, (2001), en humanos y animales demostraron una cierta maleabilidad del efecto reforzante a ciertas drogas, la cual podía debilitarse en función de un reforzador alternativo.

Habiendo delimitado el eje transversal de esta tesis con la psicología habría que puntualizar los conceptos que desde la psicología comparada definen analgesia de sedación, debido a que son dos conceptos difíciles de separar. No obstante, para efectos de esta investigación de corte experimental, se trabaja la definición de analgesia propuesta por Castañeda, es decir, la abolición de la sensibilidad al dolor sin la intención de producir sedación, entendiéndose esta última como la producción de un efecto calmante con la disminución de forma

controlada de la percepción sensorial del dolor, en este caso específico, por parte del sujeto pero manteniendo la respiración espontánea. Castañeda (1994).

Se mide analgesia a través de la disminución de la respuesta refleja a la sensación de calor detectada mediante terminaciones nerviosas llamadas termorreceptores, que se encuentran situados bajo la piel. Estos receptores recogen los cambios de temperatura y disparan una respuesta refleja ante el estímulo adverso como parte de una respuesta adaptativa para la supervivencia. Lima, Aldana, Casanova y Casanova (2003).

Eventualmente tras la administración de una droga, ambas pueden estar presentes, pero la sedación y sus parámetros no se analizan conductualmente dentro del marco investigativo de esta tesis, empero centra sus objetivos en variables de la analgesia, medidas a través de la antinocicepción en modelos bioconductuales experimentales descritos por la psicología comparada.

Muchas de las investigaciones en psicología comparada; Bakke, Carné, García (1994); Miranda, Conde, Celis y Corzo (2009), utilizan modelos bioconductuales experimentales con técnicas e instrumentos que se han mejorado con el propósito de perfeccionar el estudio de la conducta animal, tipificando aquellas variables que interesan homologarse a la conducta humana.

Esta investigación utilizó dos modelos bioconductuales experimentales, en primer lugar, un instrumento llamado Tail Flick para evaluar a través de un modelo bioconductual de dolor térmico agudo: la analgesia o antinocicepción

expresada conductualmente en términos del reflejo de retirada de cola, midiendo los tiempos de reacción.

La evaluación antinociceptiva que se realizó en esta investigación utiliza el método algesiométrico (métrica de la analgesia) del Tail-Flick de la marca Ugo Basile. Este ensayo se basa en la inducción de un dolor agudo térmico mediante la aplicación de radiaciones infrarrojas (I.R.) que se aplica en la cola del roedor en su tercio proximal, el Tail Flick (ver figura 1 en anexos) mide digitalmente el tiempo que dura en manifestarse el reflejo de retirada de cola como respuesta al estímulo calórico, respuesta psicofisiológica ante el dolor; esta diferencia de tiempo nos da una idea de cuánto tiempo es capaz el animal de soportar el calor (tiempo de latencia), lo que es proporcional al efecto analgésico de la muestra.

El otro instrumento es el laberinto en cruz elevado o Plus Maze de la marca PAN LAB (ver figura 2 en anexos), que se utilizó en esta investigación para evaluar ciertos parámetros conductuales (conducta exploratoria), que posteriormente a la luz de la psicología comparada se analiza con el propósito de encontrar respuestas asociadas al estrés y la ansiedad en humanos; ejercicio que data de hace aproximadamente un par de décadas, para evaluar psicofármacos en las primeras etapas de los estudios clínicos farmacológicos. Bakke, Carné, García (1994).

Los estudios clínicos de fase I, son los primeros estudios que se realizan en seres humanos con una nueva sustancia química y parten de los datos

farmacológicos obtenidos en animales, estos estudios pre-clínicos tiene como objetivo fundamental, demostrar la seguridad y tolerabilidad del compuesto, para lo que intentan averiguar la dosis máxima tolerada y definen, a través de estudios de la conducta, la naturaleza de las reacciones observadas. Velásquez (2001).

Citando a Miranda, Conde, Celis y Corzo (2009):

El comportamiento exploratorio de ratas en Laberinto en Cruz Elevado (LCE) es utilizado en el estudio de trastornos de ansiedad generalizada. Este modelo evalúa la exploración de la rata en un nuevo ambiente que presenta dos zonas diferentes: una potencialmente aversiva (área central y brazos abiertos) y otra segura (brazos cerrados). El movimiento del animal puede ser explicado en primera aproximación como el resultado de una ponderación entre la motivación de explorar y la aversión que experimenta en una determinada posición del laberinto. En su estado natural la rata elige estar cerca de superficies verticales, preferiblemente rincones y lugares con poca iluminación, los campos abiertos y las alturas le causan aversión, lo que explica por qué la rata permanece más en los brazos cerrados que los brazos abiertos.

Otros autores Lister (1987), Griebel, Moreau, Jenck, Martin, Misslin (1993), Salum, Morato, Roque-da-Silva (2000), Conde, Ayala, Botelho de Oliveira, Berena, Velásquez (2001), coinciden de igual forma que el estudio de

aspectos psicológicos como el estrés y la ansiedad en modelos animales permiten un acercamiento válido de lo que podríamos observar en el ser humano, que, si bien no se deben analizar de facto, permiten hacer aproximaciones al respecto, en especial para analizar el efecto de sustancias químicas sobre conductas específicas asociadas a ansiedad, en especial si se operacionaliza conceptualmente, aspecto contemplado en esta investigación.

Otro autor importante en abordar el estudio experimental de la ansiedad fue Wolpe, que propuso a partir de la psicopatología experimental una definición operacional; éste viene a definir la ansiedad como:

...una respuesta autónoma de un organismo individual concreto después de la presentación de un estímulo nocivo y que, de forma natural, posee la facultad de provocar dolor y daño en el individuo (por ejemplo, una descarga eléctrica); en términos de aprendizaje, la ansiedad sería tanto una respuesta condicionada como una respuesta incondicionada, pudiendo ser las respuestas de ansiedad ante los estímulos condicionados superiores incluso a las producidas ante los estímulos incondicionados. Wolpe, (1979).

Estudiar la ansiedad de forma experimental en un laberinto elevado en cruz o plus maze requiere la evaluación de un grupo de variables específicas. En las investigaciones citadas, Lister (1987), Griebel, Moreau, Jenck, Martin, Misslin (1993), Salum, Morato, Roque-da-Silva (2000), Conde, Ayala, Botelho

de Oliveira, Berena, Velásquez (2001), como en otras de la misma línea; las variables medidas fueron: el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto (TBA), tiempos de permanencia en los brazos cerrados del laberinto (TBC), entradas a los brazos abiertos (EBA), entradas a los brazos cerrados (EBC), veces que cruzan el área de confluencia entre los brazos (Cruz), tiempo de permanencia en la zona de confluencia (Cruz), significancia estadística (p). Se fijó el nivel de significancia en el 5%. Miranda, Conde, Celis y Corzo (2009).

Otra variable importante que utilizan los investigadores cuando analizan la ansiedad, son las defecaciones y las micciones, según Becerra, Madalena, Estanislau, Rodríguez, Dias (2007), en donde se miden reacciones emocionales como congelamiento, piloerección, defecación y micción, estas últimas respuestas que inicialmente sólo eran emitidas como producto de marcado territorial o necesidad de evacuación per se.

En este estudio como en el de Holland (1985), el aumento de la frecuencia y magnitud de estas respuestas (micción y defecación) es considerado un indicador de ansiedad. Gerzovich (2006), especialista en etología, describe signos comportamentales de trastornos de 'ansiedad' en los gatos: reacciones de escape, inmovilidad, agresión por irritación y por miedo, comportamientos conflictivos, micciones y defecaciones las cuales separa de la aparición de un comportamiento de marcaje urinario con la de micciones urinarias y defecaciones cuando los felinos son expuestos al estímulo aversivo, siendo estas últimas las manifestaciones más frecuentes de la ansiedad en el gato.

En esta investigación se analizan precisamente estas manifestaciones de temor y conductas homologadas a lo que en psicología comparada se conoce como ansiedad, es decir mide a través del instrumento llamado Laberinto en cruz elevado o 'Pluz Maze', la conducta exploratoria a través de lo que se conoce como 'head deaping' o agachado de cabeza, mientras el animal se encuentra en el área de confluencia (cruz), el número de veces que cruza el área de confluencia (cruz) y se elabora un índice estadístico con estas variables discretas al que se le llama índice de respuestas ansiolíticas y se contrastan en lo que se define como el índice de manifestaciones de temor o índice de patrones conductuales ansiogénicos que incluyen las variables discretas como el número de micciones u orinas y el número de excrementos.

Por otro lado analiza también estadísticamente la variable continua llamada tiempo de permanencia en el área de confluencia de los brazos (cruz) para cada uno de los eventos en las diferentes dosis estudiadas.

De antemano se realizó una revisión diaria del animal durante las dos semanas de investigación que permite un acercamiento con el animal, en donde el animal 'se acostumbra' a través de la canulación y la manipulación para que se habitúe, tanto a las técnicas a las que el animal va a ser expuesto, como la exposición con otro ser vivo en relación directa con él, llamémosle 'investigador'. Este manejo animal envuelve en sí dos aspectos elementales:

Primero, la exposición previa genera habituación en el animal, para que el temor del animal al investigador se reduzca, este se acostumbra a la manera en

que este lo manipula, a su olor, a sus brazos, a la canulación con agua, en general, a aspectos específicos en los que se incurre a la hora de su manipulación para que esta no sea un importante ruido de fondo en las manifestaciones de temor durante la etapa de análisis de la conducta durante los ensayos experimentales.

En segundo lugar permite que se haga un ‘control diario’ del estado de salud del animal, observando variables descriptivas que podrían presentarse y que lo descalifican como candidato a sujeto experimental en esta investigación, variables descriptivas tales como, descoordinación en las conducta motora (ataxia), pérdida reflejo de enderezamiento, pérdida del reflejo corneal, intranquilidad (pérdida del reflejo pineal), parálisis patas anteriores, parálisis patas traseras, parálisis de la cabeza, pérdida de la actividad prensil, reacción de alarma, temblores finos del cuerpo, temblores fuertes del cuerpo, fasciculaciones o movimientos involuntarios musculares y oculares, convulsiones clónicas (tipo epilexia), tónicas (contracturantes) o mixtas: contracción y distensión repetida y temblorosa de uno o varios músculos de forma brusca y generalmente violenta), reacción de alarma, enoftalmia (globo ocular hundido), exoftalmia (globo ocular saltado de su órbita), ptosis parpebral (párpado superior caído), nistagmus (movimiento incontrolado de los ojos), lacrimación y movimientos estereotipados (comportamiento motor repetitivo, aparentemente impulsivo y no funcional ej., sacudir o mover las patas, balancear el cuerpo, mover o golpear la cabeza repetidamente, mordisquear objetos, auto morderse, pincharse la piel, relamerse repetidamente, entre otras similares).

C. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La relevancia de evaluar la cannabis que se cultiva en nuestro país a través de la conducta no solo radica en la preponderancia de los modelos '*in vivo*' que a diferencia de los '*in vitro*', estudian los efectos globales de una droga, está más acorde al materialismo dialéctico, a la lógica Hegeliana o al funcionalismo descrito por William James (1890), en su libro 'Principios de Psicología': los fenómenos de la mente son una corriente y son selectivos; la mente no existiría si no fuera porque cumple una función: adaptarse a las circunstancias cambiantes.

Interesa también reunir información de respuestas conductuales (no condicionadas), relacionadas sensorialmente a la percepción ante el dolor (las respuestas reflejas al estímulo no condicionado) y evaluar el cambio de las respuestas cuando se introduce un tratamiento (una planta psicoactiva). Pues si bien el dolor, tiene un asidero bioquímico, se traduce al final en una respuesta sensorial (umbral de dolor), una respuesta adaptativa para la supervivencia, que varía según ciertas condiciones ambientales al aumentar y disminuir los niveles de estrés y ansiedad, fluctuando así con las emociones. Davidoff, (1990).

Por lo que interesó establecer su efecto en dos mecanismos en SNC: el primero, en la actividad analgésica que mitiga su dolor (percepción sensorial vs aumento del umbral del dolor), y el segundo en la actividad ansiolítica, que reduce sus niveles de ansiedad (a la muerte por ejemplo); al bajar la ansiedad, es posible también que aumente el umbral de tolerancia al dolor, como lo hiciera Salas (2004).

Otro elemento de interés que motivó esta investigación, es la posibilidad en el ámbito costarricense al inicio de fases clínicas, con terapias psicofarmacológicas alternativas en las que se utilicen cannabis o sus derivados para personas que padecen dolor crónico y aquellos que lidian con la ansiedad de la cercanía a la muerte, debido a enfermedades terminales como el cáncer u otras enfermedades crónicas, aspecto que está aún en debate político.

Se retoma el cuestionamiento político actual al realizar esta investigación, ‘la marihuana como una alternativa terapéutica’, que facilite el acompañamiento psicológico del paciente de cuidados paliativos dentro del modelo ‘biopsicosocial’ debido a que el mejoramiento de la calidad de vida es uno de los ejes primordiales dentro de las ciencias fácticas y aplicadas de la psicología, y en este ámbito especialmente atañe a las psicologías de la salud.

Promover la apertura al cambio de pensamiento de las masas cuando la propuesta beneficia al pueblo, es también un movimiento en las corrientes de pensamiento que deben suscitar los psicólogos, especialmente los de las ciencias fácticas o aplicadas de la psicología; como psicólogos no podemos volver la espalda a los procesos socio-políticos, bajo la disculpa de que no son de nuestra incumbencia. Lo son y ello por requisito de nuestro trabajo a favor del desarrollo humanizador e integral de los grupos y personas. Baro (1977).

Como se mencionó anteriormente, los derivados sintéticos del cannabis tienen una actividad analgésica en cierto grado, pero cabe la posibilidad de que en un extracto en el que juegan todos los componentes químicos y no solo una fracción

aislada, medien también algunos de sus compuestos (ha de recordarse que se analiza un extracto de planta sin fraccionar), con efecto ansiolítico y tranquilizante como una alternativa para combatir el dolor entre las personas que consumirán por vía oral y con propósitos paliativos, la marihuana.

Aspectos como: el clima, el suelo, la humedad relativa, entre otros, tienen un papel preponderante en la variación de la concentración y la relación en que se encuentran los componentes activos de las plantas; por lo que analizar experimentalmente algunas de las respuestas bioconductuales de los extractos de marihuana costarricense se justifica, a pesar de que en la actualidad se están trabajando temas similares en diferentes partes del mundo.

Por lo tanto al realizar la evaluación de los extractos de marihuana costarricense, se buscó dar respuestas a las siguientes interrogantes de investigación:

¿En evaluaciones conductuales, reflejas y exploratorias en ratas a diferentes dosis de un extracto de cannabis, se dan cambios significativos como para sugerir que la misma tiene efectos analgésicos o ansiolíticos?

Partiendo del hecho de que es posible evaluar desde la psicología comparada, que los extractos costarricenses de cannabis poseen algún efecto que sugiera analgesia y ansiólisis, entendidos estos como disminución perceptiva y antinociceptiva al dolor y disminución de las conductas de evitación a espacios relacionados con el miedo anticipado.

¿Se observan en términos conductuales cambios significativos en los tiempos de reacción del reflejo de retirada de cola ante un estímulo calórico al suministrar oralmente un extracto de cannabis costarricense?

¿Se podrían interpretar los cambios en las respuestas reflejas indiscriminadas como una primera analogía a respuestas analgésicas?

¿Es posible que en la evaluación de las conductas exploratorias a diferentes dosis orales de un extracto de cannabis costarricense se den cambios lo suficientemente significativos como para sugerir que la misma tiene efectos ansiolíticos?

D. OBJETIVOS

1. Objetivo General:

Analizar en ratas, por medio de modelos de psicología experimental y comparada, el efecto sobre la respuesta al dolor y la ansiedad, de un extracto de planta de Cannabis costarricense.

2. Objetivos Específicos:

a. Evaluar a diferentes dosis el efecto analgésico de un extracto de cannabis midiendo los tiempos de respuesta refleja ante un estímulo calórico, por medio de un test bioconductual la respuesta nociceptiva en ratas.

- b. Determinar a diferentes dosis del extracto de cannabis, el efecto en las conductas exploratorias relacionadas al miedo anticipado para medir respuestas animales homologables a respuestas de ansiedad en humanos.
- c. Estimar ciertos aspectos de la conducta exploratoria a través de un instrumento bioconductual, analizando los parámetros vinculantes en modelos bioconductuales y psicofarmacológicos a respuestas de estrés y miedo anticipado también llamado ansiedad experimental en modelos animales.
- d. Contrastar los resultados obtenidos de las variables medidas (respuestas conductuales de los modelos animales, vs dosis) caracterizadas en este estudio como homologas de las que median en la ansiedad y percepción al dolor en humanos.
- e. Comparar estadísticamente si el extracto de cannabis posee propiedades analgésicas y ansiolíticas a diferentes dosis.

3. Objetivos Metodológicos:

- a. Recopilar información sobre los tiempos de reacción del reflejo de retirada de cola tras administrar 3 diferentes dosis de los extractos de Cannabis elaborados en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica, con plantas incautadas provenientes de la zona de Bribri, usando el instrumento llamado Tail Flick.
- b. Registrar información sobre tiempos de reacción y algunas respuestas conductuales que podrían sugerir un efecto ansiolítico de los extractos de Cannabis elaborados en la Facultad de Farmacia de la

Universidad de Costa Rica, , con plantas incautadas provenientes de la zona de Bribri utilizando el instrumento llamado Pluz Maze.

- c. Comparar las medias de las variables medidas en las conductas de los sujetos experimentales y la existencia de diferencias significativas en al menos uno de los promedios (ratas).

METODOLOGÍA

A. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESTRATEGIA METODOLÓGICA.

El presente es un estudio experimental del cannabis, al igual que otros similares ha de enfrentarse a limitaciones de las acciones farmacológicas y terapéuticas de los derivados del cannabis, como lo han sido:

“...el desconocimiento del producto activo y de sus dianas biológicas, la ausencia de ensayos clínicos controlados y de estudios epidemiológicos... las dificultades para controlar las dosis administradas y la posibilidad de acciones crónicas no observables en la administración aguda...” Ramos y Cabrera, (1999).

Pesa además el hecho que al hablar de parámetros conductuales, psicofarmacológicos y bioconductuales para una especie de mamífero concreta, no se pueden extrapolar y/o generalizar directamente a las respuestas que se obtendrían en otras especies, debido a la derivación cada una de las especies, a la operacionalización de los conceptos diferenciales en psicología comparada y en salud mental humana, esto quiere decir que los parámetros analizados en animales

son solamente homologables (no iguales), al complejo psicológico que presentan los animales humanos.

Al hablar de parámetros homologables, es lícito aclarar que el concepto de homólogo es utilizado en esta tesis, no como “igual a”, si no como “similar a”; tradicionalmente es usado en algunos estudios de psicología comparada, estudios bioconductuales, farmacológicos, fisiológicos y en otros casos por aquellas investigaciones trabajadas en ciencias de la conducta en donde se buscan relaciones entre conductas humanas y animales (comportamiento animal, psicología comparada, etología, psicología evolutiva entre otras), en la búsqueda de nuevos psicofármacos (psicofarmacología, ciencias bioconductuales, farmacología, entre otras), especialmente cuando se sospecha que algunos de los mecanismos de acción de ciertas drogas, aunque no son iguales, comparten similitudes importantes para establecer algún potencial efecto terapéutico de la droga en estudio con el fin de pasar a una nueva fase de estudio en humanos y ubicar las correspondencias de dichas respuestas en el marco de la psicología clínica, la psicofarmacología y la psiquiatría.

Es en esta nueva fase, donde se podrá aseverar que las respuestas animales homólogas a estrés y ansiedad, corresponden realmente a los efectos que en psicología clínica están tipificados como tal.

B. HIPÓTESIS OPERACIONALIZADAS E HIPÓTESIS ESTADÍSTICAS

1. Hipótesis investigativa (Hi):

En los experimentos con el extracto de marihuana por vía oral, al menos uno de los promedios de los tratamientos es diferente en una de las dosis estudiadas (35mg/kg, 75mg/kg, 150mg/kg).

Por tanto podríamos decir que se observan cambios significativos en alguno de los promedios de los tiempos de reacción del reflejo de retirada de cola ante un estímulo calórico, en cualquiera de las dosis orales de 35mg/kg, 75mg/kg, 150mg/kg.

2. Hipótesis nula (H0):

Los promedios en los diferentes tratamientos son iguales, por lo tanto no se observan cambios significativos en los tiempos de reacción del reflejo de retirada de cola ante un estímulo calórico, así como tampoco se observan respuestas bioconductuales que se puedan asociar a ansiedad en ratas en las dosis evaluadas (35mg/kg, 75mg/kg, 150mg/kg).

3. Hipótesis Estadísticas:

Hi_e: Al menos uno de los promedios es diferente con un nivel de significancia estadística del 5% en los análisis de varianza (ANOVA); se afirma que con el extracto de marihuana por vía oral hay cambios significativos en al menos uno de los tiempos de reacción del reflejo de retirada de cola ante un estímulo calórico entre los grupos estudiados (grupo control y grupos experimentales).

Con un nivel de significancia estadística del 5% en los análisis de varianza (ANOVA); se observa una disminución de las respuestas conductuales de evitación a espacios abiertos conceptualizados como estresores entre el grupo control y los grupos experimentales, dichos cambios se puedan asociar a respuestas de estrés y respuestas ansiosas para las dosis investigadas.

H_0 : Los promedios en los diferentes tratamientos son iguales ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \dots = \mu_c = \mu$), con un nivel de significancia estadística del 5% en los análisis de ANOVA; se afirma que con el extracto de marihuana por vía oral no hay cambios significativos en los promedios de los tiempos de reacción del reflejo de retirada de cola ante un estímulo calórico entre el grupo control y los grupos experimentales. Tampoco refleja una disminución de las respuestas conductuales de evitación a espacios cerrados conceptualizados como estresores o ansiogénicos entre el grupo control y los grupos experimentales para todas o algunas de las dosis investigadas. Por lo tanto se rechaza la Hipótesis de la investigación (H_i).

Las fórmulas a utilizar se presentan a continuación:

$$H_0: \mu_1 - \mu = 0 \quad // \quad H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0 \quad // \quad Z = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{DS_1^2}{n_1} + \frac{DS_2^2}{n_2}}}$$

Prueba de Mínima Diferencia Significativa o *LSD*:

$$LSD = t_{\alpha/2, N-k} \sqrt{CME \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

C. DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA SELECCIONAR A LOS SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN.

Sujetos no humanos de experimentación: especie *Rattus norvegicus*, de la cepa (Hsd): Sprague Dawley (véase figura 3 en anexos), suministrados por el Bioterio del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi), de la Universidad de Costa Rica, con una edad promedio de cuatro meses y 15 días, un peso promedio 230 g (\pm 10g). Se trabajó con un total de ochenta ratas. Del sexo macho un total de setenta y dos sujetos. Del sexo hembra, un total ocho sujetos.

Para asegurar su viabilidad al momento de los ensayos se observan los parámetros descritos en el punto 5 de la sección G: Definición de las variables, descritas además en la hoja de control diario que aparece en los anexos.

D. DEFINICIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS.

Los extractos se elaboran en el laboratorio de Fitofarmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica a partir de las hojas de plantas de marihuana incautadas en la zona por el Organismo de Investigación Judicial (O.I.J.). El procedimiento llevado a cabo por los expertos se describe en forma simplificada: se separa el material por zonas de recolección de los cultivos, secar hojas, florecencias y brotes, se coloca el material en una moladora mecánica (hojas y brotes de la planta) con un tamiz de 5mm. El producto molido se deja por 48 horas en una solución hidro-alcohólica (hidrometanólica o hidroetanólica), en una relación de dos partes de agua y una de alcohol. Luego se separa la hoja molida

del líquido que contiene los principios activos y otras sustancias de la planta. El líquido se condensa a través de un rotavapor, a una temperatura no mayor de 70°C.

Los animales llegan del bioterio de la Universidad de Costa Rica, semanas antes de que inicien los procedimientos experimentales propiamente dichos, en este punto se establecen los grupos que se mantendrán hasta finalizar los procedimientos experimentales, se colocan en las cajas y el investigador queda a cargo de los animales; éste ha iniciado su acercamiento a los animales, la exposición previa de ambos permite la habituación recíproca, ahí se ponen en juego variables como: la técnica de sujeción (seleccionar primero los animales que están hacia el centro y no en el borde de las cajas, presión ejercida por la mano del experimentador, previas canulaciones con solución salina al 0,9%), administrarles alimento, olor (recordemos que el experimentador no puede usar perfumes, cremas, olores fuertes, entre otros). Una vez transcurridas las semanas de habituación se inicia con los experimentos.

Se hacen dos grupos de treinta y dos animales, un grupo de ocho ratas hembra para realizar la DL50, y un grupo de 8 machos a los que se les someterá a las pruebas para establecer la curva algesiométrica de dosis-respuesta.

Se inicia con la DL50 para establecer la dosis letal del extracto, con un análisis de la toxicidad aguda que tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de la sustancia a probar, en este caso del extracto de cannabis. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.

La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y duró 5 días[♦], el punto final del estudio no fue la muerte del animal, sino la determinación que esta dosis produce unos severos efectos adversos. Los animales fueron sacrificados y autopsiados, se realiza una macro autopsia. En general, el test se inicia con 5 ratas y una dosis de 5000 mg/kg y en caso de haber una DL100 o dosis letal absoluta se continua con las 3 ratas restantes a una dosis de 3000 mg/kg. Este es un método abreviado que intentan reducir el número de animales a sacrificar sugerido, revisado y aprobado por la ASTM (1987), que viene en el manual de técnicas de uso y cuidado de animales de laboratorio del LEBi.

Se utilizan 7 ratas macho, se designan como grupo CA, los animales del grupo de la curva algesiométrica, se distribuyen en 2 cajas, con 3 y 4 animales respectivamente.

Curva algesiométrica: Esta curva es un preliminar para establecer: 1- El tiempo de inicio de la respuesta analgésica, 2- El papel que juega el condicionamiento instrumental (comportamiento - castigo - estímulo adverso), puesto que se repite el tratamiento, 3- Cambios abruptos o estereotipados en la variable respuesta, ante la exposición repetida al factor (variable independiente o estímulo calórico).

El resto de las jaulas se estandarizan con cuatro animales cada una. Dos jaulas (cajas) para cada grupo.

Al primer grupo de treinta y dos animales se le designará como Grupo A, y entra con dos semanas de diferencia con respecto al grupo B. El grupo de treinta y dos animales con el que se inician las pruebas se designa como Grupo A.

[♦] Puede durar de 7 a 14 días.

Habiendo trascurrido el tiempo de las semanas de habituación se inicia con el diseño experimental de bloques aleatorios. La administración de la sustancia se ensaya de la siguiente manera: se aplica el extracto y el placebo (solución salina) por canulación oral. El extracto de cannabis se disuelve en un volumen de 4ml de agua destilada.

Se les privará de agua una hora antes de iniciar los ensayos, ya que en la privación de agua por más de dos horas los animales podrían deshidratarse.

La variable control es el extracto de marihuana. (planta de marihuana de la zona sur del país, zona de Bribri) y el grupo control es al que se le administra solución salina al 0.9% (suero fisiológico).

El grupo A y el grupo B tendrán a su vez cuatro subgrupos de ocho sujetos cada uno, divididos en ocho cajas con cuatro ratas cada caja, rotuladas debidamente: (1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A); (1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B).

Se utilizan grupos de ocho, para que la muestra sea estadísticamente significativa, en ensayos dentro de ambientes controlados.

Según las Técnicas y Procedimientos de Investigación CYTED, OEA (1998), seis animales serían suficientes pero, se corre el riesgo de muerte del animal o bien una enfermedad y que entonces deba descartarse, al quedar un grupo con menos de 6 animales se carecer de significancia estadística. Con un grupo de ocho animales, la pérdida de uno o dos de ellos no invalida el grupo, pues queda con seis, que aún es un grupo estadísticamente aceptable.

Los ensayos están estructurados de manera secuencial, en un diseño estadístico de bloques aleatorizados, por lo que se requerirá utilizar un control en cada grupo de pruebas. Se contemplará análisis de Mínima Diferencia Significativa (LSD), para analizar el comportamiento intragrupo en el ANOVA.

E. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: dos sacos de aserrín o burucha; dieciocho bebederos; dieciocho cajas tamaño #5 (cada una con capacidad para cuatro ratas, a las cuales se les cambiará la ‘burucha’ día por medio una vez que los animales estén en ellas); tres kilos de alimento para roedores, gabacha, guantes, solución salina, extractos de cannabis (Refrigerador de custodia del LEBi).

Se utilizarán las siguientes pruebas en ese orden de evaluación:

1. Evaluación Parámetros de “Control Diario” (Ver lista en Anexos)
2. Test de Laberinto en Cruz (Pluz Maze) Modelo PAN LAB
3. Test Open Field
4. Tail Flick Hugo Basile modelo 7360 (ver figura 3 de los anexos)
5. Bolsa se suero fisiológico (sol. Salina 0,9%)

Nota: Los test se realizarán bajo la dirección y las normas que establece para su uso el LEBi, las recomendaciones del Director y la asesoría de los Lectores. Las hojas de calificación y los detalles técnicos de aplicación son extraídos del Manual de Técnicas y Procedimientos de Investigación del Programa Iberoamericano de

Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). La metodología de los ensayos se hará de manera sistemáticamente secuencial.

F. DEFINICIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS Y LAS TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS

Como se ha citado, dicha evaluación se investiga por métodos de estadística aplicada clásica. A utilizar, el análisis de varianza (ANOVA), permitiendo la medición de las diferencias significativas de las variables cuantitativas (continuas y discretas).

La metodología de esta investigación en Psicología experimental exige verificar si existe diferencia en los promedios para los diferentes valores de las variables nominales; debido a que las variables derivan de sus valores nominales, que van de valores codificados a valores numéricos.

Se debe considerar el problema de la estimación de los parámetros del modelo como si se tratase de estimar los parámetros de la distribución de probabilidad de la variable dependiente (dosis) versus la variable independiente (tiempos de reacción). Por lo tanto, el problema de estimar el vector de parámetros de las variables equivale a la estimación de la media del vector de observaciones.

El análisis de la varianza, ANOVA, se utilizará para la prueba de hipótesis, como método para comparar las medias (promedios). En especial se utilizará el análisis de la varianza de dos factores como diseño que permitirá estudiar simultáneamente los efectos de dos fuentes de variación, por ejemplo las conductas

tipificadas que pudieran obtenerse por efecto de la droga (dosis de extracto de THC), de las características de una variable independiente (aprendizaje), para poder distinguir entre éstas y las conductas tipificadas (efectos bioconductuales tras la administración de una dosis de droga psicoactiva). Procedimiento:

1. Análisis estadístico de la varianza para las medias de los tiempos de reacción de las conductas reflejas del sujeto vs dosis del extracto con una significancia del 5%: Que busca probar el posible efecto analgésico, midiendo las diferencias significativas entre el grupo control y la dosis. Además se analizan las diferencias significativas entre cada una de las dosis. Por ejemplo: Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico vs una dosis de 35mg/kg
2. Análisis de la varianza de los tiempos de reacción de las conductas reflejas ante un estímulo calórico a lo largo del tiempo con una significancia del 5%: Que busca probar si hay diferencias significativas en cuanto aprendizaje a los instrumentos. Si existen diferencias significativas a lo largo del tiempo de exposición al Tail Flick entre cada uno de los grupos, que suponga que las diferencias significativas se deban al aprendizaje para cada sujeto entre el grupo control y la dosis.
3. Además con la prueba de mínima significancia estadística, LSD, se analizan las diferencias significativas entre cada una de las dosis. Por ejemplo: Medición del tiempo del reflejo de retirada de cola ante un estímulo calórico a los 30min.

G. DEFINICIÓN DE VARIABLES

Unidades estadísticas (1, 2 y 3) y sus variables cuantitativas: Evaluación de conductas reflejas que evalúen antinocicepción o efecto analgésico.

1. Tiempos de reacción de las conductas reflejas del sujeto vs dosis del extracto.
Busca probar el posible efecto analgésico midiendo las diferencias significativas entre el grupo control y la dosis. Además se analizan las diferencias significativas entre cada una de las dosis.
 - a. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico vs dosis: 0 mg/kg
 - b. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico vs dosis 35 mg/kg
 - c. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico vs dosis 75 mg/kg
 - d. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico vs dosis 150 mg/kg
2. Tiempos de reacción de las conductas reflejas ante un estímulo calórico a lo largo del tiempo:
 - a. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico a 30min.
 - b. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico a 60 min.
 - c. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico a 90 min.
 - d. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico a 120 min.
 - e. Tiempo de retirada de cola a un estímulo calórico a 150 min.
3. Medición de conductas exploratorias que sugieran un efecto ansiolítico.
Variables:
 - a. Tiempos de reacción, vs Dosis del extracto.
 - b. Tiempo que permanece en un área, vs Dosis
4. Medición de variables cuantitativas discretas. Excretas en un tiempo de 5min., vs Dosis
 - a. N° de veces que cruza un área en un tiempo de 5min., vs Dosis
 - b. N° de veces que agacha la cabeza y cuerpo en un tiempo de 5min., vs Dosis
 - c. N° de defecaciones y micciones en un lapso de tiempo de 5min., vs Dosis

5. Variables descriptivas medidas en la DL50, previo y durante la evaluación de las variables cuantitativas:

- a. Reacción de alarma e intranquilidad.
- b. Descoordinación de la conducta motora (ataxia).
- c. Pérdida reflejo de enderezamiento, del reflejo corneal, (perdida del reflejo pineal).
- d. Pérdida de la actividad prensil.
- e. Temblores finos o fuertes del cuerpo.
- f. Enoftalmia (globo ocular hundido), o exoftalmia (globo ocular saltado).
- g. Ptosis parpebral (parpado superior caído).
- h. Nistagmus (movimiento incontrolado de los ojos).
- i. Lacrimación.
- j. Movimientos estereotipados (comportamiento motor repetitivo, aparentemente impulsivo y no funcional ej., balancear el cuerpo, mover o golpear la cabeza repetidamente, mordisquear objetos, relamerse repetidamente, entre otras similares).

6. Definición de los procedimientos y las técnicas para la recopilación de datos

Primer semana: Se inicia el trabajo de laboratorio con el grupo DL (8 horas de trabajo). El día de ingreso, se pesa y se marca con **ácido pícrico* a

* El *ácido pícrico* ha demostrado ser un eficaz marcador de animales de laboratorio, debido a su baja toxicidad y a lo perdurable de la marca.

todos los animales y se distribuyen en ocho cajas que contengan cuatro animales cada caja. Los animales deben habituarse a vivir en grupos de cuatro.

Se marcan y se pesan los ocho animales hembra con los que se van a trabajar. A los animales marcados del uno al cinco, se les introduce con una cánula oral (ver figura 6), una dosis de 5000 mg/kg de extracto de marihuana, dosis que se establece según el método OECD para estimar la toxicidad oral aguda en ratas basado en el procedimiento propuesto por Bruce (1985), revisado y aprobado por la ASTM (1987), que viene inserto en el manual de pruebas para DL50 de la entidad reguladora de uso y manejo de animales de experimentación, CICUA y en la guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio.

Se observa por 48 horas (dos días). Si este animal muere, la dosis letal es menor que 5000 mg; si el animal sobrevive, deben dosificarse tres animales más con la misma cantidad. Si los animales sobreviven, se reporta que la dosis letal en el 50%, o DL50 es mayor a 5000 mg. Si alguno muere, deben hacerse los ensayos respectivos a una dosis menor (2000 mg).

Se realiza una línea base utilizando a los animales del Grupo A.

Se canulan siete ratas en intervalos de tiempo de dos minutos y medio cada una (2' 30''). Cuando se termina de canular la última rata, se inicia la lectura de la primer rata canulada. Se procede de igual manera en cada uno de los puntos correspondientes, respetando los tiempos. (Ver tabla 1).

Tabla 1.

Tiempos de canulación para la curva algesiométrica.

Primer punto	Segundo punto	Tercer punto	Cuarto punto	Quinto punto
15 min.	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos

Fuente: Elaboración propia

Grupo A.

Se inician los procedimientos de habituación con los animales del Grupo A para que se acostumbren a la manipulación del experimentador. Ese día se pesan los animales y se marcan con ácido pícrico. Se administra solución salina a los animales, a través de una cánula por vía oral. Dieciséis ratas para campo abierto y dieciséis ratas para Pluz Maze. Control intrasujeto (16 horas de trabajo), CAJAS 1-A, 2-A, 3-A y 4-A: Control: ocho ratas ♂, canuladas con solución salina fisiológica.

Transcurridas las dos semanas de habituación se inicia con los tratamientos:

Dosis Media: Se administra con una cánula por vía oral a una dosis de 75mg/kg, basándose en las dosis usadas por ocho ratas a intervalos de tiempo de dos minutos y medio (2' 30''), cada una. Cuando se termina de canular la última rata, se espera 10 minutos y luego se inicia la lectura de la primer rata canulada.

Dosis Alta: Se canulan ocho ratas con una dosis de 150 mg/kg a intervalos de tiempo de dos minutos y medio (2' 30''), cada una. Cuando se termina de canular la última rata, se espera 10 minutos y luego se inicia la lectura de la primer rata canulada.

Grupo Control: Se canulan con solución salina ocho ratas a intervalos de tiempo de dos minutos y medio (2' 30''), cada una. Cuando se termina de canular la última rata, se inicia la lectura de la primer rata canulada.

En la tabla 2 que se muestra a continuación, se ejemplifica uno de los programas de trabajo experimental para el análisis de la conducta exploratoria en Pluz Maze:

Tabla 2.

Programa de canulación para experimentos con Pluz Maze

1er hora:	2da hora:
0 min. Canulación del animal 1	0 min. Canulación del animal 3
15 min. Canulación del animal 2	15 min. Canulación del animal 4
30 min. Lectura animal 1 en Plus Maze (5 min.)	30 min. Lectura animal 3 en Plus Maze (5 min.)
45 min. Lectura animal 2 en Plus Maze (5 min.)	45 min. Lectura animal 4 en Plus Maze (5 min.)
3er hora:	4ta hora:
0 min. Canulación del animal 5	0 min. Canulación del animal 7
15 min. Canulación del animal 6	15 min. Canulación del animal 8
30 min. Lectura animal 5 en Plus Maze (5 min.)	30 min. Lectura animal 7 en Plus Maze (5 min.)
45 min. Lectura animal 6 en Plus Maze (5 min.)	45 min. Lectura animal 8 en Plus Maze (5 min.)

Fuente: Elaboración propia

Tiempo invertido: 4 horas. CAJA 5-A y 6-A: Dosis alta: ocho ratas ♂, canuladas con extracto de THC en dosis de 150 mg/kg

Segunda semana: CAMPO ABIERTO Grupo A (4 horas de trabajo)
CAJA 3-A y 4-A: Dosis baja: ocho ratas ♂, canuladas con extracto de THC en dosis de 75 mg/kg.

Segunda semana: CAMPO ABIERTO (4 horas de trabajo) CAJA 5-A y 6-A: Dosis alta: ocho ratas ♂, canuladas con extracto de THC en dosis de 150 mg/kg.

A continuación la tabla 3, resume el programa de canulación para los experimentos con el Campo Abierto:

Tabla 3.

Programa de canulación en experimentos con Campo Abierto

3er hora:	4ta hora:
0 min. Canulación del animal 1	0 min. Canulación del animal 3
15 min. Canulación del animal 2	15 min. Canulación del animal 4
30 min. Lectura animal 1 en Campo Abierto (10 min.)	30 min. Lectura animal 3 en Campo Abierto (10 min.)
45 min. Lectura animal 2 en Campo Abierto (10 min.)	45 min. Lectura animal 4 en Campo Abierto (10 min.)
3er hora:	4ta hora:
0 min. Canulación del animal 5	0 min. Canulación del animal 7
15 min. Canulación del animal 6	15 min. Canulación del animal 8
30 min. Lectura animal 5 en Campo Abierto (10 min.)	30 min. Lectura animal 7 en Campo Abierto (10 min.)
45 min. Lectura animal 6 en Campo Abierto (10 min.)	45 min. Lectura animal 8 en Campo Abierto (10 min.)

Fuente: Elaboración propia

Con el Tail Flick se realizan las pruebas de analgesia: Durante los días de habituación se observan los criterios del punto 5, del apartado G: Definición de las variables. Los criterios tienen como fin verificar la salud de los animales y discriminar cambios de conducta debidos a estrés, dolor o enfermedad. Todos los datos se anotan en el Libro No. 1 de la Bitácora de Experimentación.

Se canulan las 8 ratas en intervalos de tiempo de dos minutos y medio (2' 30''), cada una. Cuando se termina de canular la última rata, se inicia la lectura de la primer rata canulada. Se procede de igual manera en cada uno de los grupos correspondientes, respetando los tiempos, siguiendo los criterios de la curva algesiométrica. (Ver tabla 1)

H. CRITERIOS PARA GARANTIZAR LA CALIDAD DE LA INFORMACIÓN

Se trabaja con modelos bioconductuales estandarizados y validados, tanto por las comercializadoras, y en préstamo autorizado por departamentos correspondientes.

La confiabilidad de los resultados, así como de los métodos, han sido establecidas de acuerdo a los parámetros que se usan en las investigaciones de corte cuantitativo.

Para la adecuado manejo de las prácticas de laboratorio y recolección de los datos se trabajará con la “norma ISO/IEC 17025:99” usada para acreditación de ensayos de laboratorios, seminario impartido por ECO GLOBAL Advisor on Sustainable Development y la realización de los módulos de manejo de animales impartidos por el Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi).

Además, en todo momento con la pericia, guía y revisión de los lectores y del director de la tesis, asimismo, asesores externos, pertenecientes a entidades académicas que prestan el servicio de Laboratorio de Ensayos Biológicos, que será el LEBi.

La transferencia de los datos se hará *in situ*, según corresponda en cada caso y según la naturaleza que posee la construcción del dato en cada ensayo en particular.

I. PRECAUCIONES Y PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES

Para una mejor comprensión de las implicaciones del uso de reactivo vivo en investigaciones experimentales y cuasi-experimentales se asistió al “Seminario Análisis en temas de Bioética”, impartido por el Biólogo Alejandro Leal, PhD, cuyo objetivo fue aprender la importancia de la trata responsable y respetuosa de la vida de aquellos que ayudan a la humanidad a desarrollar nuevas tecnologías en salud y el uso adecuado de animales y personas usadas en investigaciones de ésta índole. Así como repasar las premisas en que se basan las investigaciones comprometidas con la ética. (ver certificado en anexos).

Además se trabajó basado en los acuerdos estipulados en el Decreto No. 26668 del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), artículo 140 de la Constitución Política de Costa Rica, en sus incisos 3. y 18; con fundamento en La ley de promoción del desarrollo científico y tecnológico, número 7169, del 26 de junio de 1990.

Se dispuso del reactivo biológico de acuerdo con las normas y disposiciones del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica en convenio con las Universidades Públicas y Privadas del país. Se procederá al pedido utilizando el cuestionario del CICUA. (Ver cuestionario en anexos).

PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

De las 160 evaluaciones realizadas a los animales, 43.1% de las evaluaciones presentaron tiempos de reacción que variaron entre los 5 y los 8 segundos, siendo este intervalo de tiempo de respuesta refleja en la que más se acumulan datos. (Ver tabla 4)

Tabla N° 4.

Distribuciones de Frecuencia de las mediciones en el Tail Flick

Límite inferior	Límite superior	Puntos medios	Intervalo de clase	Frecuencia simple	Frecuencia relativa	Frecuencia simple acumulada	Frecuencia relativa acumulada
Intervalo	en	Segundos					
2	< 5	4	3	36	22,5	36	22,5
5	< 8	7	3	69	43,1	105	65,6
8	< 11	10	3	28	17,5	133	83,1
11	< 14	13	3	21	13,1	154	96,3
14	< 17	16	3	4	2,5	158	98,8
17	< 20	19	3	1	0,6	159	99,4
20	< 23	21	3	1	0,6	160	100,0
Total				160	100,0		

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 5

Promedios de latencia medidos en segundos en el Tail flick a diferentes dosis.

Tiempo de Medición	Promedio de Tiempos Reacción(seg.), para cada una de las dosis.				
	Control D0	Extracto D35mg/kg	Extracto D75mg/kg	Extracto D150mg/kg	Gran Total
30 min.	4,575	6,525	7,6125	6,85	6,390625
60 min.	4,0875	7,7875	9,9625	10,9375	8,19375
90 min.	4,0125	6,7375	9,9125	9,275	7,484375
120 min.	4,4125	8,3375	9,3125	7,925	7,496875
150 min.	5,1125	7,5	8,3625	10,3	7,81875
Gran Total	4,44	7,3775	9,0325	9,0575	7,476875

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 6.

Resultados del Análisis de la varianza para tiempos de reacción y dosis medidos en el Tail

Flik (prueba de analgesia)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tiempos	7,244734375	4	1,811183594	1,933871096	0,16938394	3,25916673a
Dosis	70,75414844	3	23,58471615	25,1823178	1,827E-05	3,49029482b
CME	11,23870313	12	0,936558594			
Total	89,23758594	19				

a No hay diferencia significativa entre los tiempos de evaluación

b Si hay diferencia significativa en al menos uno de las dosis

Tabla N° 7.

Resultados del Análisis de la varianza para probar el posible efecto ansiolítico

ANOVA: de un simple factor

<i>Origen de las Variaciones</i>				
<i>Grupos</i>	<i>Conteos</i>	<i>Suma</i>	<i>media aritmética</i>	<i>ANOVA</i>
<i>D0</i>	8	17	2,125	2,125
<i>D150</i>	8	7	0,875	0,410714286
<i>D150+NLX</i>	8	3	0,375	0,267857143
<i>D75</i>	8	15	1,875	1,267857143

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 8.

Resultados del Análisis de la varianza para probar variaciones entre grupos e intra grupos.

ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre Grupos	16,375	3	5,458333333	5,362573099	0,004798367	2,946685 α
Intra grupo	28,5	28	1,017857143			
Total	44,875	31	α : Altamente significativa			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 9

Resultados del Análisis de la LSD para analizar significancia entre grupos del Plus Maze

	<i>Diferencia promedio</i>	<i>Absoluto</i>	<i>LSD</i>	<i>Decisión</i>
DO-D150	1,25	1,25	1,023174396	diferencia significativa
DO-D150+NLX	1,75	1,75	1,023174396	diferencia significativa
DO-D75	0,25	0,25	1,023174396	diferencia no significativa
D150-D150+NLX	0,5	0,5	1,023174396	diferencia no significativa
D150-D75	-1	1	1,023174396	diferencia no significativa
D150NLX-D75	-1,5	1,5	1,023174396	diferencia significativa

Fuente: Elaboración propia

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este apartado se discuten los resultados obtenidos de los experimentos, así como de los análisis estadísticos de los mismos. Se pretende a la luz del marco teórico abordar los puntos que pueden ayudar a responder a los objetivos de esta investigación, pero se ha de aclarar que hay mucha información valiosa que si bien no responde a los criterios objetuales de esta investigación pueden ser evaluados en una publicación posterior.

A. SOBRE LA DOSIS LETAL DEL EXTRACTO DE MARIHUANA

Con respecto a la DL50, se establece que la dosis letal de los extractos de THC analizados está por encima de los 5000mg/kg. Podríamos conjeturar que parece haber un efecto depresor de la conducta motora de los sujetos no humanos cuando se administra en dosis de 5000mg/kg; aunque no se puede afirmar la presencia de anedonia, basándonos en lo descrito por trabajos anteriores (Flórez, 2007), (Ochoa, Madoz-Gúrpide, Leira-Sanmartín, 2008), (Waldhoer, Bartlett, Whistler, 2004), (Gutstein, Mansour, Watson, Akil, Fields, 1998), e incluso apoyando las tesis expuestas por Pertwee (2000) y por Navarro (2000), que al igual que los opiáceos, la marihuana que actúa en la vía clásica de los opioides desencadena ahí tanto analgesia como respuestas depresoras asociadas a la corteza motora en SNC; si bien los mecanismos neurofisiológicos no están bien descritos aun para el efecto registrado, el modelo *in vivo* analizado corrobora la existencia de algún mecanismo desencadenante de que las conductas motoras se manifiesten en menor escala a esta

dosis, pudiéndose deber a un posible efecto sedativo, entendiéndose éste como el efecto en el que se retardan ciertos reflejos de la conducta motora.

Se observa en la evaluación de la DL50, que al tercer día de haber sido canuladas por vía oral con el extracto usando una dosis de 5000mg/kg, una ralentización del tránsito intestinal, disminuyó la actividad motora en los animales y consecuentemente los mantuvo en un estado que podríamos denominar de letargo. Debido a la intoxicación en la que se encontraban se observa en ellos el drástico cambio de conductas; los animales al tercer día habían perdido tanto peso como agua de sus cuerpos, por lo tanto, se encontraban deshidratados al tal punto que se decide según lo establece el manual de uso y cuidado de animales de experimentación con una de las Lectoras, establecer el punto final al experimento y aplicar eutanasia a los animales, se justifica esta decisión ya que a ese paso, las ratas morirían de deshidratación y no era necesario prolongar su agonía para demostrar lo que se había dado por sentado al 3er día que habían sobrevivido a la intoxicación aguda y se encontraban en un proceso de intoxicación crónica que podía durar varios días.

La DL50 se asienta sobre los 5000 mg/kg, de este extracto de THC, pero con la advertencia de que si un individuo consume una cantidad similar, sin asistencia o compañía, siguiendo la lógica metabólica, psicofisiológica y comportamental observada en los mamíferos utilizados en el experimento probablemente podría morir a causa de los efectos adversos de la intoxicación crónica.

B. SOBRE LAS RESPUESTAS CONDUCTUALES ASOCIADAS A ANALGESIA

La disminución en los tiempos de reacción (latencia), revelan con claridad una posible respuesta analgésica central, como se discutió anteriormente, analgesia y efecto tranquilizador van paralelos (de igual manera que depresión de las conductas motoras o disminución de los reflejos motores y sedación), de manera tal que las respuestas motoras de animales más tranquilos y aletargados también puede que afectara los tiempos de reacción; no es claro si dichas diferencias se deben a un retraso de la función motora o analgesia central.

Los estudios de Rodriguez y Wu (2007) entre otros, ayudan a esclarecer y este dilema. En su tesis, se desencadenan procesos ligados a analgesia sin que se genere tranquilización propia de sistema nervioso central, debido a que los mismos extractos parecen tener efecto analgésico periférico es decir activan los procesos neuronales de la nocipercepción (nocicepción).

Probablemente exista un efecto tranquilizante no sedativo, más para efectos de esta tesis ese dilema no es el medular, debido a que el objetivo es probar si hay un potencial efecto analgésico. Y se logra establecer estadísticamente que los sujetos no humanos de experimentación si reaccionan significativamente ante el estímulo doloroso.

C. SOBRE LAS RESPUESTAS CONDUCTUALES HOMÓLOGAS A ESTRÉS Y ANSIEDAD

Aunque la respuesta conductual a la ansiedad o como esta se entiende en la psicología clínica, se analiza diferente en humanos y ratas, esto debido a la capacidad de los primeros de simbolizar, hay en ambos una línea base de respuesta conductual, es decir, en ambas especies mamíferas, estas respuestas conductuales nos preparan para un peligro latente, nos producen respuestas emocionales de miedo, activadas principalmente por la amígdala en nuestro cerebro, sea o no sea este real, importa acá que es percibido como tal y desencadene esas respuestas de miedo anticipado, sin tratar de anular su importante papel en la adaptación, dichas respuestas o manifestaciones de temor anticipado es lo que se ha venido trabajando en esta investigación como ansiedad experimental desde la psicología comparada. González y Rabia (2010), Lazarus y Folkman (1984), Ardilla (1985).

Son el ambiente percibido como agreste, el impulso o el instinto de auto-preservarnos, las conductas adaptativas residuales (¿epigenéticas o aprendidas?), a ese impulso de evitar situaciones percibidas como peligrosas, son lo que primordialmente condicionan cuales situaciones similares han de percibirse peligrosas y que serán dignas de ser evitadas evitamos exponernos a lo que nos puede dañar de una u otra forma. Son lo que James y Lange (1922), en su teoría llamarían estímulos sensoriales que provocan emociones, produciendo cambios en los órganos viscerales a través del sistema nervioso autónomo y en los músculos del esqueleto a través del sistema nervioso somático. Carlson (2006).

Esta cadena de estímulos sensoriales y respuestas conductuales que nos preparan para la lucha o la huida se dan gracias a los componentes bioquímicos implicados cuando el individuo y por ende su cerebro, sienten una amenaza, ese conjunto de reacciones del estímulo adverso generado ante el peligro lo designamos como estrés. Un complejo conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre cada vez que un evento, llamémosle ‘desagradable’, o una situación que pone en peligro al individuo de la cual podríamos decir a la luz de nuestra experiencia que es ‘desagradable también’ se graban en el encéfalo y dejan su cicatriz, es decir, una marca que se repetirá cada vez que se perciba que un evento similar ocurre y se mezclara con otras de índole similar, en un conjunto de respuestas bioconductuales a las que podríamos llamar aprendizaje.

Devolviéndonos al punto donde analizamos la cadena de estímulos sensoriales y respuestas bioconductuales denominadas estrés, se establece que ese aprendizaje de posibles circunstancias peligrosas nos condicionan para evitar eventos similares, desencadenando conductas de evitación y estrategias para afrontar eventuales peligros, dichas estrategias de afrontamiento exacerbadas son las que de una manera simplificada llamaremos ansiedad. Es decir, el conjunto de cicatrices psicofisiológicas que se activan cuando un conjunto de eventos que son percibidos y que corteza cerebral recibe e interpreta estímulos sensoriales como peligro real pero que aún es latente, entonces las reacciones conductuales se manifiestan, alimentan nuevas respuestas fisiológicas.

De interés en esta tesis, las respuestas conductuales de este tipo, derivadas de respuestas de afrontamiento exacerbadas denominadas ansiedad. Se evalúan

entonces dos conductas, la de evitación a espacios que exponen al peligro y la de micción como respuesta que aliviana nuestro peso, produce olores y almizcles desagradables para nuestro predador y nos prepara para la huida.

Se observa que los animales presentan menos conductas homologas a lo que se denominaría ansiedad en humanos y las pruebas estadísticas corroboran dichas observaciones al analizar los datos arrojados. La cannabis puede producir tanto ansiedad (asociado al THC), como ansiólisis (CBD) Grotenhermen (2006), esto va a depender primero del individuo y segundo de las concentraciones en que se encuentren estos componentes en la planta. Se plantea acá la interrogante, ¿Se debe dilucidar si la marihuana que crece en la zona Bribri de Costa Rica, tiene una significativa concentración de CBD?

Las limitaciones de la psicofarmacología o la psicología comparada dejan esta conclusión por fuera. Este es un aspecto a evaluar por la farmacología, la fitoquímica, la química medicinal u otras áreas diferentes a la psicología.

CONCLUSIONES

El extracto de marihuana administrado vía oral en dosis de: 35mg/kg, 75mg/kg, 150mg/kg, parece producir cambios bioconductuales pertinentes a los enmarcados en los objetivos de esta investigación en los sujetos no humanos de experimentación. Dichos cambios se podrían homologar a lo que en humanos se interpretaría como un efecto analgésico.

El ANOVA de las mediciones de la variable respuesta a diferentes tiempos no muestra diferencias significativas, sin embargo el ANOVA de las mediciones del factor dosis muestra diferencia significativa, lo que sugiere que a lo largo del tiempo se mantiene el efecto a partir de los 30 minutos y continúa luego de los 120 min. El extracto evaluado parece ser analgésico inclusive transcurridas 2 horas y media desde su ingesta.

La prueba de Mínima Diferencia Significativa (LSD), para los datos de analgesia, revelan que hay diferencias significativas con alfa de 0,5% entre el control y los grupos a los que se le aplicaron las dosis de 35mg/kg, 75 mg/kg y 150mg/kg.

Además revelan que hay diferencias significativas entre el grupo al que se le aplicó la dosis de 35mg/kg, y 75mg/kg, habiendo también diferencia significativa entre el grupo de 35mg/kg y el de 150mg/kg. Sin embargo no existe diferencia significativa entre el grupo de 150mg/kg y el de 75mg/kg de extracto, lo que sugiere que una dosis de 75mg/kg podría ser tan efectiva en términos de analgesia como una de 150mg/kg.

Por otra parte los resultados del ANOVA para los datos analizados sugieren que el extracto de cannabis es ansiolítico, es decir, que produce cambios conductuales sobre la conducta exploratoria, disminuyendo el miedo anticipado.

Dicha prueba estadística de los datos analizados, revela cambios altamente significativos. La prueba de LSD, revela que esta significancia estadística se da entre el grupo control y los grupos a los que se les aplicó la dosis de 150mg/kg de extracto y 150mg/kg de extracto más naloxona. Pareciendo tener estas dosis un efecto ansiolítico.

También revela la prueba del LSD, cambios significativos entre el grupo al que se le administró una dosis de 75mg/kg y el grupo al que se les aplico la dosis de 150mg/kg de extracto más naloxona. Pero no hay diferencias significativas entre el grupo control y el grupo al que se sometió a la dosis de 75mg/kg de extracto, pareciendo ser que esta última dosis no tiene un efecto ansiolítico.

Tampoco existen diferencias significativas entre el grupo al que se le administró 75 mg/kg y el grupo al que se le administró 150mg/kg del extracto. No existe tampoco una diferencia significativa entre el grupo al que se le administró 150mg/kg y al grupo que se le administró esa misma dosis y además la naloxona.

Al analizar los datos de la conducta exploratoria se deduce de las anteriores conclusiones que la dosis de 150mg/kg de extracto de naloxona disminuye el miedo anticipado con mayor eficacia y presenta mayor propensión a ser ansiolítica que la misma dosis sin la naloxona.

En términos estadísticos se puede aseverar con un nivel de significancia estadística del 5% en los análisis de ANOVA, que el consumo oral de extracto de marihuana en las dosis de 35mg/kg, 75mg/kg, 150mg/kg, produce un efecto analgésico, observable a través de cambios en los tiempos de reacción del reflejo de retirada de cola ante un estímulo calórico y en las dosis 150mg/kg y 150mg/kg más naloxona, con respecto a ratas no tratadas, parece producir una disminución de las respuestas conductuales asociadas a un efecto que contribuye a atenuar la ansiedad.

Los datos de las respuestas sugieren que efectivamente el estudio de la marihuana evaluada genera cambios conductuales que podrían homologarse a respuestas en humanos, indiscriminadamente ansiolíticas o relajantes, que se miden a través de parámetros bioconductuales de las respuestas a conductas asociadas a analgesia, estrés y ansiedad en los modelos utilizados.

Retomando estas conclusiones a la luz de la psicología reflexológica, la psicobiología, la psicología conductual y comparada, es lícito decir que para los extractos de marihuana costarricense median de forma importante dos aspectos psicológicos ligados al placer en los sistemas de recompensa, el primero es el bienestar por disminución del dolor dado por analgesia central y el segundo un efecto que reduce los estados de alerta dado por una disminución del miedo anticipado o efecto ansiolítico, evaluado acá como disminución de la ansiedad experimental.

Aunque no se declara muerte animal en la DL50, para dosis tan altas como 5000mg/kg, parecieran haber parámetros ligados a un efecto depresor central en dosis tan

altas como 5000mg/kg, que pueden ocasionar una intoxicación crónica que llevaría a la muerte por factores similares a la caquexia, es decir, deshidratación, desnutrición, fatiga, debilidad, seguida de inanición, subsecuentemente hipotensión ortostática, desequilibrio electrolítico y si no hay intervención asistencial, probablemente la muerte.

Para un uso terapéutico bajo regulación profesional, la marihuana puede ofrecer útiles aportes a la salud humana, sin embargo el consumo abusivo trae consigo serias consecuencias. La planta de marihuana como otras plantas psicoactivas, si es mal empleada, no deja de ser un riesgo a la salud. Los estados alterados de la psique que conlleva su abuso pueden distorsionar nuestra percepción de los riesgos asociados a su consumo indiscriminado o irresponsable, una planta que como otras muchas en la historia de la humanidad juega con esa doble vía, la de tener un uso responsable para fines altruistas y humanitarios que la convierte en benéfica o un uso insano que la transforman en algo perjudicial.

Si bien la DL50 no nos dice que altas dosis producen la muerte, si nos dice que al elevar la dosis de su consumo se manifiestan respuestas de intoxicación tan severas que pueden inhibir aquellas conductas que nos permiten preservar la vida. Si algo se puede dar por sentado en esta investigación, es que su consumo reduce los tiempos de reacción de nuestras respuestas reflejas, disminuye el reflejo, mientras conducimos, mientras trabajamos con herramientas peligrosas, mientras realizamos conductas que dependen de respuestas rápidas o de capacidades psicológicas que nos permitan evaluar los riesgos,

conductas que dependen del equilibrio bioquímico cerebral, que biológica, evolutiva, filogenética y adaptativamente hablando, han durado miles de años en instaurarse para poder regodearnos diciendo que nuestra especie llevo la utilización de la herramienta, de la comunicación y del pensamiento al nivel más complejo entre todos los seres vivos de este planeta.

En relación a los fines que de la misma se persigan, de las aplicaciones y de su uso, es importante exhortar en esta investigación estructurada dentro de un marco ético y científico, que no se menosprecian los peligros que conllevan un uso irresponsable o abusivo de esta planta, y que en el peor de los escenarios, en afán por el placer, se ha visto aunque en casos aislados, puede desencadenar brotes de enfermedades mentales en el usuario, que lo llevan al internamiento en hospitales de salud mental; pero sin dejar de lado que los aportes de investigaciones en esta misma línea, se deben tener en cuenta cuando del bienestar, la calidad de vida y la salud del ser humano se trate, ya que estos son ejes primordiales que atraviesan el quehacer profesional de la psicología y de la salud mental en general.

REFERENCIAS

- Adams, B., Martin, R. (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. Oxford, England. *Addiction Rev.* Vol. 122, p. 33-34
- Almela, P. (2008) Implicación de diferentes cascadas de señalización intracelular en los cambios adaptativos observados durante la dependencia de morfina. Tesis. España. Universidad de Murcia, p. 108 - 116
- American Psychological Association. (2010) Manual de publicaciones. (3° ed., texto traducido al español de la sexta edición). México: Editorial El Manual Moreno, S.A.
- Amador, G. (2005) Ponencia breve sobre situación de drogas en adolescencia y niñez en Costa Rica. San José, Costa Rica. Instituto sobre Alcoholismo y Farmacodependencia, p. 13
- Ardila, R. (1965). Behaviorismo. Hacia una psicología científica. Colombia. *Revista de Psicología*, 10, 2, 85-91.
- Ardila, R. (1986). Significado y necesidad de la psicología comparada. Colombia. *Revista Latinoamericana de Psicología*. Vol. 18, 2, p. 157-169.
- ASTM (1987). Método para estimar la toxicidad oral aguda en ratas. Prueba Estándar: E 1163-87. American Society for Testing and Materials, Philadelphia Pa, USA.
- Bakke O., Carné X., García, A. (1994). Investigación y desarrollo de nuevos fármacos. En: Bakke OM, Carné X, García-Alonso F (ed). *Ensayos clínicos con medicamentos*. Mosby/Doyma Libros. p. 45-55.
- Baldauf, J. (2006) Oral administration of slow-release naloxone for prevention of constipation but not analgesia following oral morphine. Germany, Homburg/Saar.. Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes, D-66421.

- Baro, M. (1977) *Psicología, ciencia y conciencia (compilación de textos) (a)*. San Salvador: UCA editores.
- Becerra, A., Madalena, A., Estanislau, C., Rodríguez, J., Dias, H. (2007) *Ansiedad y miedo: su valor adaptativo y maladaptaciones*. Brasil. *Revista Latinoamericana de Psicología*. Vol. 39, 1, p. 75-81.
- Bejarano, J., Ugalde, F. (2003a) *Consumo de Drogas en Costa Rica, Resultados de la Encuesta Nacional 2000-2001*. San José, Costa Rica: Instituto sobre Alcoholismo y Farmacodependencia, p. 19-21
- Bejarano, J., Ugalde, F. (2003b) *Tendencias de consumo de drogas en niños y adolescentes*. San José, Costa Rica: Instituto sobre Alcoholismo y Farmacodependencia, p. 27
- Berrendero, F., Maldonado, R. (2002) *Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Δ^9 -tetrahydrocannabinol*. *Psychopharmacology*. Barcelona, España. Editorial de la Universidad de Barcelona, Vol. 163. p. 9-14
- Bickel, W. y Marsch, L. (2001). *Toward a behavioral economic understanding of drug dependence: delay discounting processes*. *Addiction*. Vol. 96, p.73-86.
- Bisset, N. G. (1994). *Herbal drud and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientist basis*. Medpharm Sientific Publishers, Stuttgart, U. K.
- Bobes, J. Calafat, A (2000) *Monografía Cannabis..* Palma de Mallorca, España. Editorial *Rev. Adicciones*, Vol. 2, 48-49, 64-71, 79-85
- Bruce R. (1985). *An Up-and-Down*. Procedimiento para la prueba de toxicidad aguda. *Fundam. Appl.Tox.* Vol. 5, p. 151-157.
- Bruneton, J. (2001) *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales*. 2ª Edición. Acribia, Zaragoza.

- Campos, A. (1986) El ejercicio profesional de la psicología en Costa Rica, Información, base y propuestas metodológicas para su investigación evaluativa y permanente. San Jose, C.R. IIP. P. 12.
- Carlson, N.R. (2006). Fisiología de la Conducta. España; Pearson, p. 192.
- Carter, W. E., Coggins W. J., Doughty, P. L. (1976) Chronic cannabis use in Costa Rica. Instituto Nacional contra el abuso de Drogas, Florida, USA. Publicación Gainesville, p. 28-29
- Castañeda, F. (1994) Anestésicos generales o hipnóticos utilizables en sedación. En: Medicina Crítica Práctica. Sedación y analgesia en el paciente grave. Edit Edika Med. 1994. P. 57-72.
- Castellano, C., Rossi-Arnaud, C., Cestari, V., Costanzi, M. (2003) Cannabinoids and Memory: Animal Studies. Roma, Italia. Universidad de Roma. Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders.. ISBN 1568-007/03, Vol. 2, N° 6, 389-402
- Claudet, T. (1970) La situación de la psicología en Costa Rica. Colombia. Revista Latinoamericana de psicología. Vol. 2, 1, p. 9-13.
- Conde, C., Ayala, J., Botelho de Oliveira, S., Berena, A., Velásquez, M. (2001) La vía visual puede ser el disparador de ansiogenicidad en el modelo del laberinto en cruz elevado. Salud UIS Vol. 33, 190-195.
- Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D., Giagnoni, G. (2002) Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the syntetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. London: British Journal of Pharmacology.. ISBN 0007-1188/02, Vol. 135, 181-187

- Corella, R. (1994). Agricultura ilícita en Costa Rica. San José, Costa Rica. Tesis para optar por el grado de licenciatura en la Escuela de Derecho, Universidad de Costa Rica, p. 7
- Cordero, T., Salas, J. (1999) Psicología y mercado laboral: ¿Estamos en crisis o se nos está viniendo? ¿Qué hacemos? San José, C. R. Revista costarricense de psicología. Año 15, 30, p. 11-13. Publicación del colegio profesional de psicólogos de Costa Rica.
- Corredor, R. (2004). Dolor crónico en neurología. ACN publicaciones. Asociación Colombiana de Neurología, Bogotá, Colombia. 01.16 00:54:49 -05'00' <http://www.acnweb.org/pub/guia/PDF> Revisado el día 14 de junio del 2007.
- Davidoff, L. (1990) Introducción a la psicología. España. McGraw Hill, p. 560 – 610.
- Duval, F., González, F., Rabia, H. (2010). Neurobiología del estrés. Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría, Chile. ; 48 (4): 307-318.
- Escohotado, A. (1998). Historia General de las Drogas. Editorial Espasa-Calpe. España. ISBN 84-239-9739-1, pp. 41-42, 56.
- Enda-Caribe, Asociación ANDAR, Programa TRAMIL (1997). Uso tradicional y validación de plantas medicinales de los afrocostarricenses. Ferlini Editores de Centroamérica. San José, Costa Rica, pp. 14-22.
- Fields, H. (1998). Anatomy and physiology of pain. New York: American Medical Association, pp. 37-39
- Flórez, J. (2007) Fármacos opioides: Características farmacológicas. In: Ars Médica, editor. El tratamiento farmacológico del dolor. Barcelona: 2007: 73-116

- Fonseca, S., Bejarano, J. Ugalde, F. (2004). Consumo de Drogas en la Juventud Adolescente, San José, Costa Rica. Acta Psiquiátrica y Psicológica de América Latina. Vol. 50(3), 16-22
- Fornaguera, J. (1989). Efectos de la restricción proteico - calórica gestacional, en el condicionamiento operante de ratas adultas, mediante horarios de reforzamiento (razón fija). San José, Costa Rica. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Universidad de Costa Rica, pp. 8-9.
- García, M. Coto, T., Soto, G. Pazos, L. (2003). Toxicidad sub-crónica y prueba de irritabilidad ocular del extracto acuoso de las hojas de Plantago major (Plantaginaceae). San José, Costa Rica. Revista de biología tropical. Vol 51, 34-37
- García, M. Morales, O. (1996). Efectos cardiovasculares del extracto acuoso de las hojas de Clusia coclensis (Guttiferae). San José, Costa Rica. Revista de biología tropical. Vol 44, 16-18
- Gerzovich, C. (2006). Comportamiento animal. Buenos Aires - Argentina. <http://mvz.unipaz.edu.co/textos/lecturas/etologia/miedo2c-fobia-y-ansiedad-en-gatos.pdf>
- Greenwood, J. (2011): Historia de la Psicología. Un enfoque conceptual. México. Mc Graw Hill
- Griebel, G., Moreau, J., Jenck, F., Martin, J., Misslin, R. (1993) Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. Cambridge. Behavioural Processes Vol. 29, 37-48.

- Grotenhermen, F. (2006) Los cannabinoides y el sistema endocannabiniodes. Versión española. Alemania. Nova-Institut, Goldenbergstraße. Cannabinoids. Vol. 1, Nº 1, p. 10-14.
- Gutiérrez, G. (2003). Psicología experimental y psicología comparada. En L. Flórez (Ed), El legado de Rubén Ardila. Psicología: de la biología a la cultura. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Gutstein, HB. Mansour, A. Watson, SJ. Akil, H. Fields, HL. (1998). Mu and kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuroreport* 9(8):1777-1781.
- Guy, H. (1998). Progresos recientes en la enfermedad del dolor de las lesiones nerviosas. Wales. *Neurologic Clinics Journal*, Vol 16, 13-15
- Hofbauer, D. Rainville, P. Duncan, G. Bushnell, M. (2001). Representación cortical de la dimensión sensorial del dolor. *Journal of neurophysiology*. Vol 86, 402-407
- Holland, P. (1985). Element pretraining influences the content of appetitive serial compound conditioning in rats. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, Vol. 11, 3, p. 367-387.
- James, W. (1989) Principios de psicología. USA. Fondo de cultura económica. Vol. 1, p. 29-30
- James, W., Lange, C. (1922). The emotions. Vol. I. USA. Williams & Wilkins Company. Digital Press.
- Jensen, H. (1995) Universidad y Desarrollo. San José, C.R. Editorial EUCR, p.16.
- Jiménez, G., Lizano, M., Morales, J., Solera, G. (1982) Un estudio de casos, características de personalidad del adolescente consumidor de marihuana. Tesis para optar por el

grado de licenciatura en la Escuela de Psicología, Universidad de Costa Rica, p. 11-

12

Lambert, D., Fowler, C. (2005). The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. USA. *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 48, 16, p. 5059–5087.

Lazarus, R., Folkman, S. (1984) *Stress appraisal and coping*. New York. ED. Springer publishing company, Inc. p. 152-171

León, J., Poveda, L., Sánchez-Vindas, P. (2000) *Nombres comunes de las plantas en Costa Rica*. San José: ED Guayacán, p.63-71

Lima, G., Aldana, L., Casanova, P., Casanova, P. C., Casanova, C. (2003) *Inducción y medición del dolor experimental*. Cuba. *Revista Cubana de medicina militar*. Vol. 32, 1, p. 49-56

Lister, R. (1987) *The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse*. *Psychopharmacology* Vol. 92, p. 180-185.

Loeches, A., Gil-Burmann, C., Pelaez del Hierro, F. (1994) *La psicología comparada: Una disciplina psicobiológica*. Madrid. *Revista de psicología general y aplicada*. Vol. 47, 1, p. 53-57

Manson, W., Lott, D. *Etología y psicología comparada*. Título original: *Ethology and comparative psychology*. *Annual Review of Psychology*, Vol. 27, p 129-154.

Martínez, J., Páez, A., Valero, M., Salguero M. (2002). *Síndrome de Abstinencia*. Málaga, España. Ediciones Hospital Regional Carlos Haya, p. 49

- Miranda, D., Conde1, C., Celis, C., Corzo, S. (2009) Modelado del Comportamiento de Ratas en Laberinto en Cruz Elevado Basado en Redes Neuronales Artificiales. Colombia. Revista Colombiana de Física, Vol. 41, 2, p. 406 – 408.
- McGilveray L. (2005) Pharmacokinetic of cannabinoides. Ottawa: Suppl. A. Vol. 10, 13-14
- Mulheran, M., Middleton, P., Henry, J. (2002), The acute effects of tetrahydrocannabinol on auditory threshold and frequency resolution in human subjects. New York. Human & Experimental Toxicology. Ed. Arnold Publishers. Vol. 21. 289-292.
- Muñoz, C. (1993). Efecto de un sistema de desnutrición durante la lactancia, sobre el aprendizaje, bajo parámetros de un horario de ración fija 50, en ratas blancas Sprague Dawley San José, C.R. Tesis de Licenciatura en Psicología. Universidad de Costa Rica, pp. 11-23
- Navarro, M. (2000). Mecanismos neurobiológicos implicados en la dependencia a cannabinoides. Madrid. Artículo de la Agencia Española Antidroga. ISBN84-8174-475 113-123, p. 32
- Ochoa E, Madoz-Gúrpide A, Leira-Sanmartín M. (2008) Problemática legal como predictor de pronóstico en pacientes con dependencia de opiáceos sometidos a tratamiento con naltrexona: variables relacionadas. *Psiquiatría com* 2008; 12(1).
- Olmos, A (1988): Efectos de un sistema de desnutrición durante periodo de gestación sobre parámetros conductuales producto de la implantación de un horario de reforzamiento en ratas blancas Sprague dawley. San José, C.R. Trabajos Finales de Graduación, Universidad de Costa Rica, p. 15
- ONUDD: Organización de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (2004) Informe Mundial sobre las Drogas. Buenos Aires, Argentina. Editorial asociada de la ONU.. ISBN 92-1-348094-6, Vol. 1, 73-76

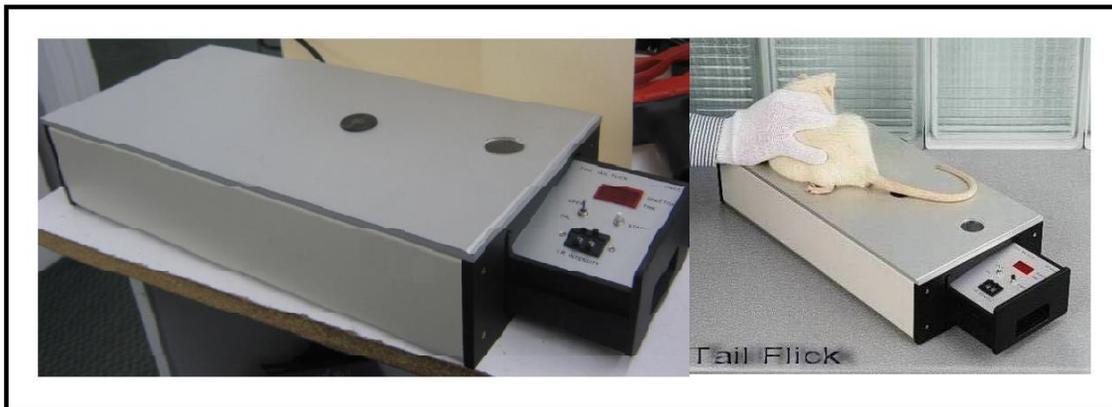
- UNODC: Organización de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (2009) Informe Mundial sobre las Drogas. Austria. Editorial de la ONU. ISBN 978-92-1-148240-9, p. 106-114
- UNODC: Organización de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (2012) Informe Mundial sobre las Drogas. Viena. Editorial asociada de la ONU p. 11, 62-73
- Page, J. B., Fletcher, J. M. (1991) Some psychosocial aspects of chronic cannabis use. Miami, Florida. Editorial Canarias. Publicación s.l.: s.n. ISBN 362.295.097.286, p. 09
- Pertwee, R. (2000) Neuropharmacology and therapeutic potential of cannabinoids. Portland. ADDICTON Biology, Jan 2000, Vol. 5. Nº 1, 10-37
- Pertwee, R. (2002) Novel Pharmacological Targets for Cannabinoids. Nueva York Current Neuropharmacology,. Bentham Science Publishers. ISBN 1570-159X/04, Vol. 2. Nº 1, 9-29
- Palomino, O. (2001). Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes el Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).
- Porter, A., Felder, C. (2001). The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. London. Pharmacology & Therapeutics Review. Vol. 90, 45-60
- Química Fina Farmacéutica. (1998). Manual de Técnicas y Procedimientos de Investigación del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X (1995) Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región. Caracas, Ediciones CYTED-OEA, p. 69-82

- Quirce, C., Odio, M., Solano, J. (1977). Correlatos bioquímicos-fisiológicos del stress anticipable incondicionado e intervalo fijo. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica, pp.19-26
- Ramos, J., Cabrera, J. (1999). Cannabis ¿Hasta Dónde! Madrid, Editorial Harcourt. Declaración de Madrid, Agencia Antidroga, pp. 17-21, 32-36, 55, 66-78, 94-101
- Rodríguez, L., Wu, J. (2007). Determinación de la actividad antiinflamatoria, nociceptiva y fagocítica de fracciones de Cannabis sativa (Cannabaceae), Tesis para optar por el grado de licenciatura. San José, Universidad de Costa Rica, p. 56
- Salas, I. (2002). The use of cannabis and cannabinoids in Palliative care. University of Wales College of Medicine, pp. 22-23
- Salum, C., Morato, S., Roque-da-Silva, A. (2000) Anxiety-like behavior in rats: a computational model. Neural Networks Vol. 13 p. 21-29.
- Secretaria de salud, México (2009). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Comisión permanente de la Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos, p 2529-2650.
- Sociedad Española de Investigación Sobre Cannabinoides (2002). Guía Básica sobre los Cannabinoides. Madrid: ED. SEIC. ISBN 84-699-8658-9, 06-12
- Szabo, B., Wallmichrath, I., Mathonia, P., Pfreundtner, C. (2000) Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata Germany: Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Albert-Ludwigs-Universität,. PII: S0306-4522(00)00036-1, pp. 08-14
- Vargas, G. (1992). Efecto de diferentes agentes anorexígenos sobre la conducta exploratoria libre y los niveles sanguíneos de ácidos grasos y glucosa libre en ratas.

- San José C.R. Tesis de Licenciatura en Farmacia, Universidad de Costa Rica, pp. 43-44
- Wade, D., Robson, P., Makela, P., Aram, J. (2003). A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. Oxford: Hospital University, pp. 83-87
- Wachtel, S., ElSohly, M., Ross, S., Ambre, H. (2002). Comparison of the subjective effects of D9-tetrahydrocannabinol and marihuana in humans. Perdue University, New Jersey. *Psychopharmacology*. Vol. 161. 331-339.
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. (2009) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem*; 73:953-990.
- Wilson, E. O. (1975). *Sociobiology: The new synthesis*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Wolpe, J. (1979). *Psychotherapy by reciprocal inhibition*. Stanford: Stanford University.
- Zubizarreta, A. (1998), *La aventura del trabajo intelectual. Cómo estudiar e investigar*. Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio (USA), Adison-wesley iberoamericana.

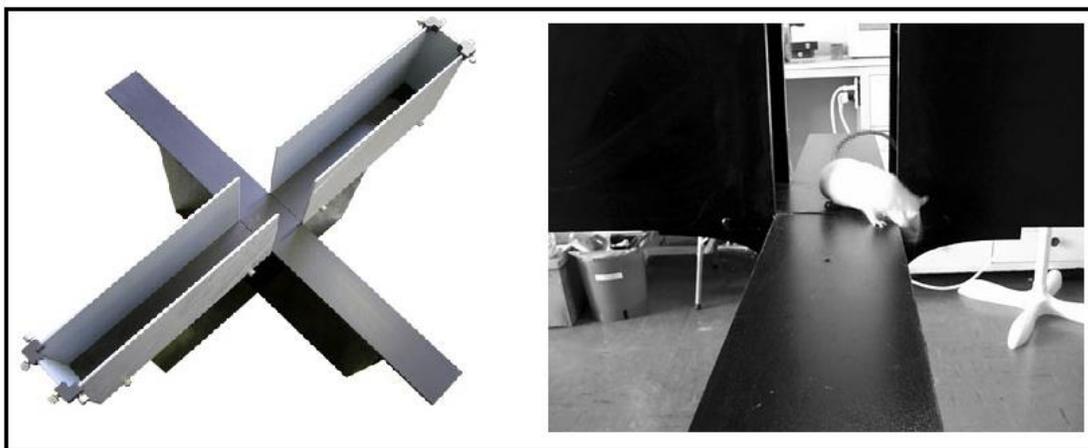
ANEXOS

Figura 1. Tail Flick, marca Ugo Basile, modelo 7360 y técnica para su uso en roedores.



Fuente: www.ebay.com / www.serlab.co.kr

Figura 2. Laberinto elevado en cruz (Plus Maze), marca Scientific Instrumets, PAN LAB, modelo LE 840, serie N° 6205/02.



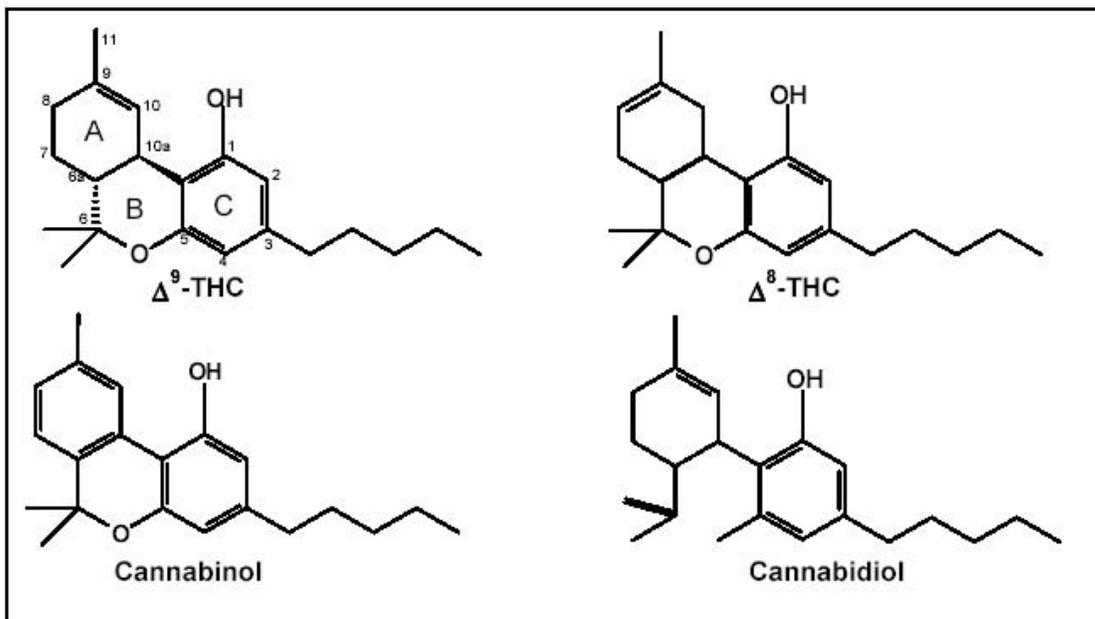
Fuente: www.panlab.com

Figura 3. Rata albina. *Rattus norvegicus*, de la cepa (Hsd): Sprague Dawley



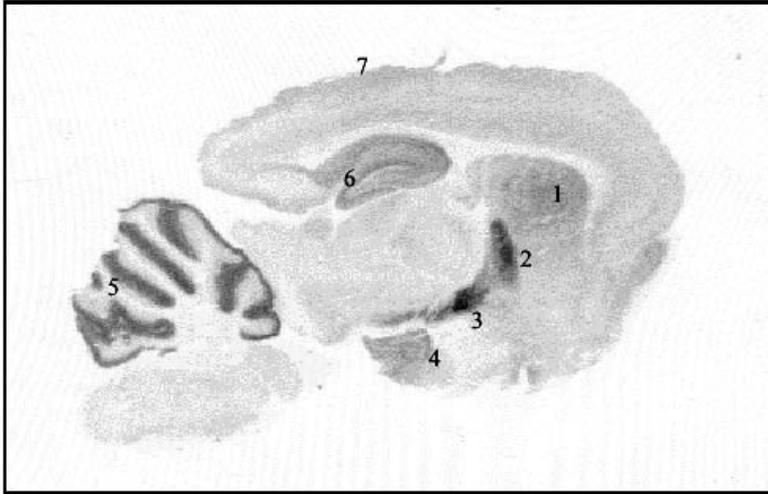
Fuente: Foto tomada en el Laboratorio de ensayos biológicos

Figura 4. Principales estructuras químicas de cannabinoides



Fuente: ¡Cannabis hasta Donde! (1999)

Figura 5. Corte sagital de cerebro de rata adulta. Distribución de receptores CB1
(1, caudado y putamen; 2, globo pálido; 3, núcleo entopenduncular; 4, sustancia nigra; 5, cerebelo; 6, hipocampo; 7, corteza cerebral)



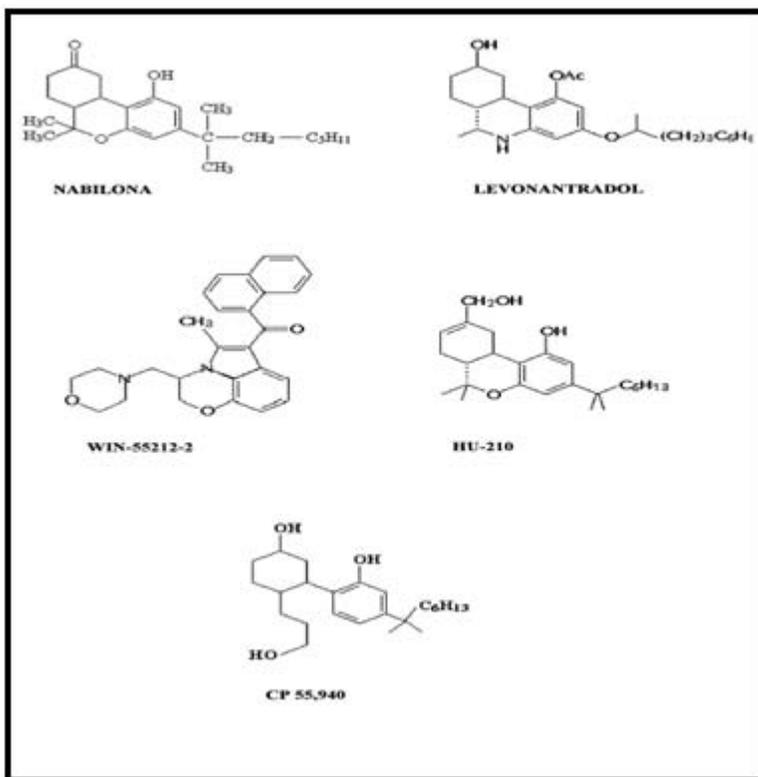
Fuente: Monografía Cannabis (2000)

Figura 6. Cánula oral intragástrica.



Fuente: www.thomasscientific.com

Figura 7. Ejemplos de cannabinoides sintéticos.



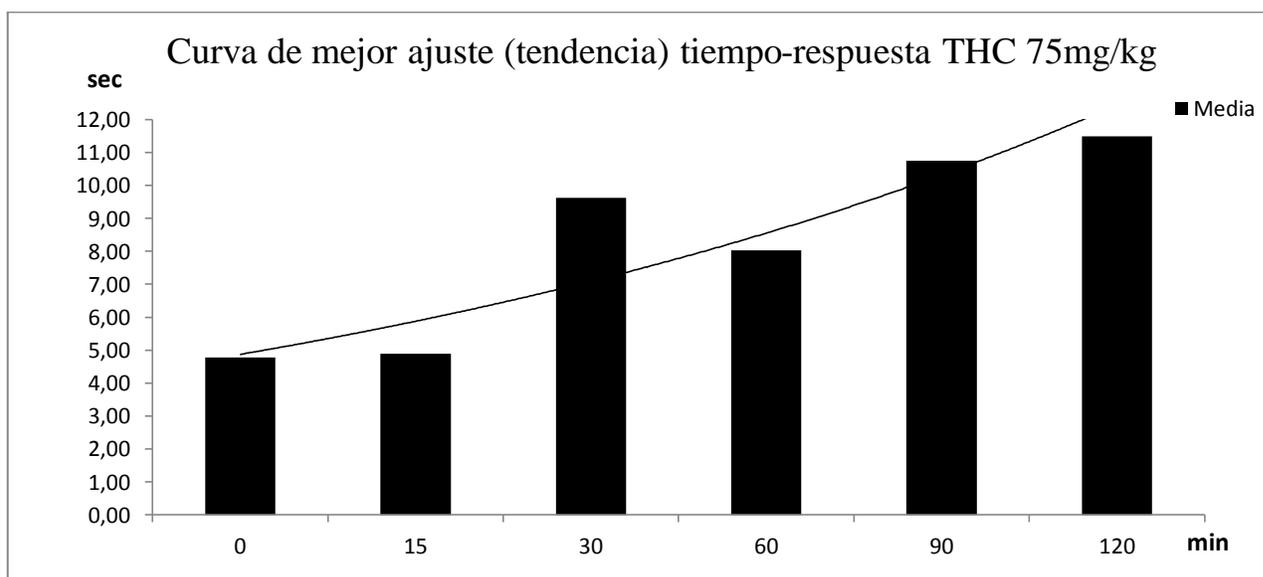
Fuente: Monografía Cannabis (2000)

DATOS OBTENIDOS

CURVA TIEMPO-RESPUESTA TAIL FLICK-THC 75mg/Kg (36 sujetos evaluados)

Tiempo medición tras la administración	Latencia en segundos de los sujetos						Media aritmética
GRUPO 1 (Control)							
# Animal	1	2	3	4	5	6	
0min	4,4	5,4	4,7	3,9	4,6	5,7	4,78
GRUPO 2							
# Animal	1	2	3	4	5	6	
15min	3,1	6,3	5,5	4,8	4,9	4,7	4,88
GRUPO 3							
# Animal	1	2	3	4	5	6	
30min	11,3	5,5	6,8	13,8	11,7	8,6	9,62
GRUPO 4							
# Animal	1	2	3	4	5	6	
60min	7,7	8,4	6,4	7,7	9,1	8,9	8,03
GRUPO 5							
# Animal	1	2	3	4	5	6	
90min	12,9	12,3	9,4	9,5	14,4	6	10,75
GRUPO 6							
# Animal	1	2	3	4	5	6	
120min	10,9	12	11,3	13,6	9,9	11,2	11,48

Nota: Una medición por sujeto



DATOS TAIL FLICK (32 sujetos evaluados)

Tiempo medición tras la administración	Latencia en segundos de los sujetos							
GRUPO CONTROL								
# Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
30min	4,3	4,6	5,1	3,7	6,3	5,5	4,1	3
60min	3,6	3,8	4,1	3	6,5	5,5	2,2	4
90min	3,7	5,2	4,3	3	2,8	3,9	4,3	4,9
120min	4,1	3,7	4,3	5,1	3,9	5,1	4,8	4,3
150min	4,8	3,8	6	5,6	6,2	5,2	3,6	5,7
GRUPO 35mg/Kg THC								
# Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
30min	5,7	6,2	11,6	5,1	6,3	4,8	6,7	5,8
60min	11,1	5	10,9	6,2	7,3	5,3	6,5	9,6
90min	6	5,4	9,3	3,9	9,1	7,5	6,6	6,1
120min	12,3	5,9	11,2	5,5	8,2	5,4	6,1	12,1
150min	11,2	5,5	14,9	5,4	7,6	4,5	4,8	6,1
GRUPO 75mg/Kg THC								
# Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
30min	7,3	6,3	8,9	7,2	5,8	7,2	8,4	9,8
60min	11,7	6,3	12,3	9	7,3	13,3	8,4	11,4
90min	4,5	6,3	12,9	7,8	13,2	2,7	9,6	22,3
120min	12,2	7,3	12,7	9,1	10,6	6	9,8	6,8
150min	6,8	7,6	13,5	7,4	7,8	5,6	10,4	7,8
GRUPO 150mg/Kg THC								
# Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
30min	5,1	4,9	6,6	10,4	10,2	6,2	5,1	6,3
60min	7,1	14,6	13,8	14,2	7,3	6,1	6,9	17,5
90min	8,7	9,7	9,6	9,9	9,7	5,2	8,9	12,5
120min	4,1	7,2	10,8	11,2	4,9	5,2	9	11
150min	5,7	12,3	10,5	11,7	10,7	5,5	10,9	15,1

Nota: Tras la administración de una sola dosis a cada sujeto se le hizo una medición en 5 tiempos diferentes (30, 60, 90, 120 y 150 minutos).

DATOS PLUS MAZE (32 sujetos evaluados)

GRUPO CONROL

	1	2	3	4	5	6	7	8
# Animal								
# Bolos (excrementos)	0	0	2	1	1	1	1	0
Cantidad de orina (micciones)	3	1	2	0	1	1	3	1
# Head deaping	0	1	1	0	2	2	3	3
# Cruces del area central	0	2	1	1	2	2	1	0
# Segundos en el área central	0	6	0	0	5	10	3	0

THC DOSIS BAJA 75mg/Kg

	1	2	3	4	5	6	7	8
# Animal								
# Bolos (excrementos)	0	4	3	0	3	5	0	1
Cantidad de orina (micciones)	2	1	1	2	2	1	3	2
# Head deaping	5	3	0	2	0	0	0	0
# Cruces del area central	2	1	0	2	0	2	0	0
# Segundos en el área central	7	3	0	6	0	8	0	0

THC DOSIS ALTA 150mg/Kg

	1	2	3	4	5	6	7	8
# Animal								
# Bolos (excrementos)	3	2	0	1	5	0	1	3
Cantidad de orina (micciones)	2	1	2	1	3	1	1	3
# Head deaping	1	1	0	0	0	0	0	0
# Cruces del area central	0	0	0	0	1	1	0	0
# Segundos en el área central	0	0	0	0	3	5	0	0

THC DOSIS ALTA 150mg/Kg + Naloxona via IP

	1	2	3	4	5	6	7	8
# Animal								
# Bolos (excrementos)	0	2	4	0	0	2	4	3
Cantidad de orina (micciones)	1	1	1	0	1	0	2	1
# Head deaping	3	1	1	0	2	2	3	2
# Cruces del area central	3	0	0	1	2	0	3	2
# Segundos en el área central	10	0	0	0	6	0	7	12

Nota: La cantidad de orina registra el número de charcos de orina dejados por el animal en el laberinto y no los mililitros, convirtiéndola en una variable discreta para su análisis

Protocolo de Experimentación

Basado en el Manual de Técnicas de Investigación del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)

Aspectos Generales:

El espacio físico, debe ser un sitio cerrado, con condiciones de luz y sonido controladas. Los experimentadores deben utilizar atuendos blancos, para no generar tonos contrastantes que introduzcan inestabilidad en la conducta de los animales, esto con el fin de controlar todas posibles variables externas. Se recomienda utilizar gabachas blancas, esto porque además de permitir una estandarización en los tonos de la vestimenta, permiten una mayor inocuidad y esterilidad. Además en aras de buscar medios estériles, se recomienda el uso de guantes a la hora de manipular los animales y el uso de protector de boca (bozal), a la hora de sacrificarlos y manipular los órganos productos de ensayo.

Se deben limpiar con fenol las mesas, una hora previa a su uso, el uso de cloruro de bezalconio es preferible en vez de fenol, debido a que el olor es menos penetrante y permite utilizar las mesas en un tiempo menor posterior a su aplicación. Se debe limpiar con alcohol de 70 grados, por ser el más idóneo para desinfectar.

Los animales deben ser identificados con algún tipo de marca, utilizándose como marcador azul de violeta y en casos excepcionales se puede utilizar un marcador permanente, que no se recomienda, si los animales van a ser reutilizados luego de los experimentos.

Criterio de Expertos:

Este procedimiento debe ser llevado a cabo bajo condiciones ambientales controladas: iluminación tenue, dispositivo de ventilación en constante funcionamiento para minimizar ruidos externos y $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ de temperatura ambiente. A objeto de no interferir en el comportamiento de los animales, entre cada sujeto evaluado se debe a limpiar cuidadosamente con alcohol las señales olfatorias de territorialidad (orina y defecación).

Los animales son pasados de un corral a otro, separando los animales que ya han sido utilizados de los que van a ser evaluados. Los animales deben de haber comido en las últimas 4 horas al menos, para evitar animales llenos, para ello se les debe sustraer el alimento 4 horas previas al experimento. No hay peligro de sustraer el alimento con más horas de anticipación hasta 6 horas, luego de 6 horas, la inquietud de los animales se puede deber al hambre. Se debe sustraer el alimento y el agua a todos por igual y al mismo tiempo.

Generalidades de la Técnica:

Se administran los productos de ensayo: El extracto y el suero fisiológico por vía oral a un lote de 8 sujetos no humanos (roedores), y se observa su comportamiento tras dosificación.

Tamizaje en Farmacología Conductual

Hoja de calificación

FECHA: _____

INFORME DEL TAMIZADO CUALITATIVO Y SEMICUANTITATIVO: Extracto de Marihuana

VEHÍCULO DE MUESTRA: hidro-alcoholico. Conc. ≈ 30 mg/mL

DOSIS UTILIZADA: _____

TIEMPO	0	5	15	30	60	90	120
--------	---	---	----	----	----	----	-----

PARÁMETROS	RESPUESTAS	(min) DESPUÉS DE	ADMINISTRAR DOSIS
------------	------------	------------------	-------------------

S.N.C.

CONDUCTA MOTORA

ATAXIA

PERDIDA REF. ENDEREZ.

ANALGESIA

ANESTESIA

PERDIDA DEL REF. CORNEAL

PERDIDA DEL REF. PINEAL

PARÁLISIS PATAS ANTERIORES

PARÁLISIS PATAS TRASERAS

PARÁLISIS DE LA CABEZA

ACTIVIDAD PRENSIL: P.A.

P.T.

REACCIÓN DE ALARMA

S.N.C.

CONDUCTA MOTORA
TEMBLORES FINOS DEL CUERPO
TEMBLORES FUERTES DEL CUERPO
FASCICULACIONES
CONVULSIONES CLÓNICAS
CONVULSIONES TÓNICAS
CONVULSIONES MIXTAS
REACCIÓN DE ALARMA

OJOS

ENOFTALMIA
EXOFTALMIA
PTOSIS PARPEBRAL
TAMAÑO DE LA PUPILA (mm)
NISTAGMUS
LACRIMACION
ANIMAL DE PRUEBA: Rata AYUNA: No. SEXO: Macho

MARCA: ____ COLOR DE MARCA: _____ PESO: ____ g VOL. ADMINISTRADO: ____ mL VÍA DE ADMINISTRACIÓN: _____

TIEMPO DE ADMINISTRACIÓN: _____

	TIEMPO	0	5	15	30	60	90	120	4h	6h
PARÁMETROS	RESPUESTAS			(min.)	DESPUÉS DE			ADMINISTRAR	DOSIS	

OREJA

PALIDEZ
HIPEREMIA
CIANOSIS

EFFECTOS GENERALES

SALIVACIÓN

ERECCIÓN DE LA COLA
ERECCIÓN PILOMOTORA
MICCIÓN
DIARREA
PRIAPISMO
SIGNO DE ROBICHAUD
MOVIMIENTO CIRCULAR
TEMPERATURA RECTAL. °C

EFFECTOS SUBJETIVOS

AGRESIVO
PASIVO
TEMEROSO

OTRAS OBSERVACIONES

Posición de estatura: -t-, a los 60 min.

NOTAS DE LA MUERTE Y AUTOPSIA (observar: parálisis resp. o cardiaca, sístole o diástole, color de la pared intestinal y pulmonar, etc.)

Observe si hay conducta estereotipada.

Resultados Y Discusión

-----UL-----

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN

**COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES**

C.I.C.U.A.

Formulario De Registro Para Utilización De Animales De Laboratorio

I.- INFORMACION PRELIMINAR

1. Tipo de permiso: Nuevo Renovación

No. de registro: _____

(Este punto 1 es llenado por el C.I.C.U.A.)

2.- Institución:

Nombre Universidad de Costa Rica	Dirección Montes de Oca, San Pedro.
---	--

3.- Departamento:

Trabajos Finales de Graduación, Escuela de Psicología.

Laboratorio de Farmacología, Facultad de Farmacia

4.- Título del Proyecto :

Evaluación Bioconductual, en ratas, del efecto analgésico y ansiolítico de un extracto de pl
de cannabis cultivadas en Costa Rica.

5- Uso propuesto de los animales:

Enseñanza

Investigación

Otros

Explique:

Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Psicología, adjunto a la Investiga-
-cion "propiedades de la marihuana" acta #12 proyecto #12, iniciado en el 2002.

6.- Duración:

6 semanas.

7.- Director del departamento o laboratorio responsable del proyecto

Nombre	Cédula	Teléfono	Fax
Dra. Beatriz Badilla Baltodano	1-399-277	2511 8330/ 0523	2511 8350

8.- Responsable(s) del proyecto:

Nombre	Cédula	Teléfono	Especialidad
Jonatan Perez Rocha			Tesario
Miguel Marquez Cueva			Psicólogo
Sandra Badilla Chaves			Farmacéutico

9. Cuenta el Departamento o laboratorio con una lista de fácil acceso de los teléfonos de todo el personal técnico y profesional que tenga a su cargo alguno de los distintos procedimientos experimentales, para ser localizados en casos de emergencia?

Si X

No ___(justifique):

--

II.- INFORMACION ESPECIFICA AL PROYECTO

- 1.- Indique de qué manera este proyecto es relevante para la salud humana o animal, o para el avance del conocimiento o del bienestar de la sociedad.

Busca comprobar el potencial ansiolítico y analgésico de un extracto de plantas de cannabis cultivados en C.R. para evaluar su posible uso con fines farmacológicos, terapéuticos y paliativos, debido a la relevancia mundial que ha tenido en los últimos años la investigación en cannabinoides y sus propiedades, quizá debido a su creciente uso (ONNUD, 2004). Es la primer investigación en C.R. que evalúa experimentalmente la posible propiedad que tienen los extractos de planta completa de Cannabis sativa, de producir ansiólisis y analgesia en mamíferos.

2. Complete el siguiente cuadro acerca del modelo experimental usado:

Modelo in vivo:

Especie/cepa:

Rattus norvegicus / Spsrague Dawley

Sexo(s):

72 machos y 8 hembras (DL50).

Edad(es)

Entre 8 semanas y 10 semanas

Peso(s)

Inicial: 185g (\pm 10g) En la Última semana: 230g (\pm 10g)

Modelo in vitro:

Cultivo celular:

N/A

Organo aislado:

N/A

Otros:

3.a. Justifique el uso de los animales, especies seleccionadas y número utilizado (Indique estadística a usar)

Es un modelo 'in vivo', y son usadas debido a su velocidad de reproducción, a su facilidad de manejo y a muchas de sus similitudes fisiológicas con el ser humano, ampliamente usadas en los laboratorios de ciencias biológicas, las ratas Sprague Dawley son muy tranquilas y fáciles de manipular y a diferencia de las ratas Wistar, estas se condicionan más lenta y prolongadamente lo que permite estudios transversales con mayor facilidad debido a que no manifestaran prontamente conductas aprendidas frente a los instrumentos (como podría ocurrir con la placa caliente). 80 ratas, es el mínimo, utilizable en tres instrumentos bioconductuales en donde en cada uno de ellos se requieren sujetos naif,

es decir sin ningún condicionamiento previo. Los grupos de 8 animales estadísticamente nos dejan un margen de dos ratas, que por variables externas deban ser descartadas del experimento (enfermedad, estrés, dolor, sufrimiento) sin perder validez estadística, en cuyos casos el sacrificio sería vano. Se escogen machos debido a que no interviene en ellos el ciclo hormonal de forma tan acusada como ocurre con las hembras (ciclo estrual), variable que deseamos controlar en esta investigación.

3.b. Indique si existen otros métodos alternativos para el tema en discusión que no requieran animales

No en Costa Rica, el uso de cannabis es ilegal en animales de la especie sapiens, no obstante es un método muy amigable para los animales de la especie novvergicus debido a que son poco invasivos y reducen el dolor y el estrés. No tenemos acceso a métodos de proteómica tan avanzados en nuestro país para acudir solo al uso de fluidos biológicos. Los ensayos farmacológicos de corte bioconductual son más exactos debido a que se observa la conducta como un todo, en el organismo vivo.

3.c. Indique fuentes de información consultadas

Manual de Técnicas de Investigación, Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región, 1998 *Manual de Técnicas y Procedimientos de Investigación del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X (1995)*. Química Fina Farmacéutica. Caracas: Ediciones CYTED-OEA.

Enda-Caribe, Asociación ANDAR, Programa TRAMIL (1997). *Uso tradicional y validación de plantas medicinales de los afrocostarricenses*. Ferlini Editores de Centroamérica. San José, C.R.

Rodríguez, L., Wu, J. (2007). *Determinación de la actividad antiinflamatoria, nociceptiva y fagocítica de fracciones de Cannabis sativa (Cannabinaceae)*, Tesis para optar por el grado de licenciatura. San José, Universidad de Costa Rica.

Bobes, J. Calafat, A (2000). *Monografía Cannabis. Vol. 2*. Palma de Mallorca, España.

Editorial Rev. Adicciones.

Salas, I. (2002). *The use of cannabis and cannabinoids in Palliative care*.

University of Wales College of Medicine.

McGilveray L. (2005) *Pharmacokinetic of cannabinoides*. Ottawa: Suppl. A. Vol. 10.

- 4.a- Describa en detalle todos los procedimientos a realizarse con los animales
indicando si son invasivos o no, crónicos o agudos.

Vía Oral, en todos los casos, procedimientos de tipo agudo. Se trabajará con un total de 80 ratas macho, divididos en 2 grupos de 32 animales para cada ensayo (Plus maze (no invasivo), open field (no invasivo) y tail flick, ((se reutilizaran los animales del open field) no invasivo), y un grupo de ocho animales para realizar la DL50, de los cuales inicialmente se iniciara con 3 animales, y se procederá a justar la DL50, con los otros 5, en caso de ser menor a 5000mg/kg. Un grupo de ocho machos a los que se les someterá a las pruebas piloto (grupo P). Las jaulas se estandarizan así con grupos de cuatro. En la quinta semana, los animales del grupo piloto (Grupo P), se utilizarán para realizar una curva de analgesia. Al primer grupo de 32 animales se le designará como Grupo A, al segundo grupo de 32 animales como Grupo B y al tercer grupo de 8 animales como Grupo DL. Administración de la sustancia a ensayar: se administrará el extracto y el placebo (H₂O) por canulación intragástrica oral a las ratas de experimentación. El volumen será de 5ml. Sexo macho, total de individuos: 72. Sexo hembra, total 8 individuos. Los animales requerirán de al menos 1 semana de ambientación y se les privará de agua una hora antes de iniciar los ensayos, ya que en la privación de agua por más de dos horas los animales podrían deshidratarse. Se utilizarán tres grupos de ratas: A, B y DL. El grupo A y el grupo B tendrán a su vez cuatro subgrupos de ocho sujetos cada uno, divididos en ocho cajas con cuatro roedores cada caja, rotuladas debidamente (1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A), (1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B). Los ensayos están estructurados de manera secuencial, por lo que se requerirá utilizar un control en cada grupo de pruebas. No se contemplará el control intrasujeto, por lo tanto se omitirá la línea base en los experimentos. Según las Técnicas y Procedimientos de Investigación CYTED, OEA (1998).

Invasivo: todo aquel procedimiento que implique la alteración de la organización estructural de tejido u órgano del animal

Agudo: aplicación del tratamiento en una sola dosis o en varias dosis en 24 horas, con un período de observación no menor de 14 días después de la aplicación del tratamiento.

Subcrónico: aplicación del tratamiento diario de 30 a 90 días, con un período de observación menor de 28 días, después de la última dosis.

Crónico: aplicación del tratamiento diario de 3 meses a no más de un año, con un período de observación no menor de 30 días, después de la última dosis.

4.b- Marque con una (X) el tipo de procedimiento experimental que será llevado a cabo con los animales.

Etológico (comportamiento)	X	Quirúrgico	Farmacológico	X	Infeccioso
Mutagénico Otros (Especifique)		Nutricional	Biológicos		Físico

5.- Marque con una X el nivel de dolor/estrés

Mínimo	X	Evitado por anestésicos	Agudo, de corta duración	X
		Crónica, de larga duración	Terminal	

Dolor/Estrés mínimo: No afecta la conducta del animal

6. Indique si se utilizará analgésico, anestésico o tranquilizante para minimizar el dolor

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Analgésico	Anestésico	Tranquilizante
<input type="text"/>		<input type="text"/>
Vías :	<input type="text"/>	Principio activo:
		<input type="text"/>
Dosis :		Nombre comercial:
Frecuencia :	<input type="text"/>	

7.- Indique los criterios utilizados para medir niveles de anestesia:

Latidos	Respiración	Relajamiento Muscular
ECG	Reflejo Corneal	Pellizco positivo de dedo
		Color de membranas/mucosas
Otro	Explique:	

8- Si existe estrés o dolor, cuáles criterios serán usados para medirlo?

Pérdida de apetito	Comportamiento anormal o letárgico X
Pérdida de peso	Posición anormal descanso X
Aspecto general X	Chupar/morder/rascar
Vocalización X	Pérdida de movilidad X
Agitación X	Protec. área c/dolor
Otro	Explique :

9.a. En caso necesario indique por qué se dará muerte a los animales.

Por eutanasia, en caso de dolor, estrés crónico o enfermedad de alguno de los Sujetos.

9.b. Cuál método de eutanasia se utilizará? Indique el tipo de drogas, dosis y vía de aplicación

Camara de CO₂/ Solicitud previa al LEBi, por el tesario y por la Decana de la Facultad de Farmacia, Dra. Sandra Badilla Chaves.

9.c. Sobre el personal responsable de la eutanasia, indique:

Nombre	Años de experiencia	Adiestramiento
Dra. Beatriz Badilla Baltodano	Mas de 15 años.	Prof. Farmacologia, UCR
Dra. Sandra Badilla Chaves	Mas de 15 años.	Prof. Farmacodependencia

10.- Duración definida:

Elabore un cronograma con cantidad de animales utilizados. (Elabore un cuadro por especie)

		# Semanal						# Semanal			
# Mensual		1	2	3	4	# Mensual		1	2	3	4
Ene						Jul					
Feb						Ago					
Mar						Set					
Abr						Oct					
May						Nov		8♀	8♂	16♂	
Jun						Dic	16♂	16♂	16♂		

Duración indefinida:

60 días maximo.

Indique el número aproximado de animales por período de tiempo:

Los animales del Grupo A y del grupo DL ingresan al laboratorio una semana antes que el Grupo B; estos tienen una diferencia de edad de 15 días. Durante los días de prueba se observan los criterios de la lista "Control Diario" contenida en los anexos. Los criterios tienen como fin verificar la salud de los animales y discriminar cambios de conducta debidos a estrés, dolor o enfermedad. Todos los datos se anotan en el Libro 1 de la Bitácora de Experimentación. El día de ingreso, se pesa y se marca con *ácido pícrico a todos los animales y se distribuyen en ocho cajas que contengan cuatro animales cada caja. Los animales deben habituarse a vivir en grupos de cuatro.

Primer semana: Se inicia el trabajo de laboratorio con el grupo DL (8 horas de trabajo). Día uno: Se marcan y se pesan los ocho animales hembra con los que se van a trabajar. A los animales marcados del uno al cinco, se les introduce a través de una cánula una dosis de 5000 mg de extracto de hojas de marihuana, dosis que según establece el método simplificado para calcular la DL50, que viene inserto en el manual de pruebas para DL50 de la entidad reguladora de uso y

* El ácido pícrico ha demostrado ser un eficaz marcador de animales de laboratorio, debido a su baja toxicidad y a lo perdurable de la marca.

manejo de animales de experimentación, CICUA. Se observa por 48 horas (2 días). Si este animal muere, la dosis letal es menor que 5000 mg; si el animal sobrevive, deben dosificarse tres animales más con la misma cantidad. Si los animales sobreviven, se reporta que la dosis letal en el 50%, o DL50 es mayor a 5000 mg. Si alguno muere, deben hacerse los ensayos respectivos a una dosis menor (2000 mg).

Primer semana: Se inicia el piloto con los animales del Grupo A para que se acostumbren a la manipulación del experimentador. Ese día se pesan los animales y se marcan con ácido pícrico. Se realiza una prueba piloto, utilizando el Plus Maze y el campo abierto. Se administra agua a a 16 animales, a través de una cánula para vía intragástrica. Se trabaja 4 horas por sesión. La inversión de tiempo es de dos animales por hora de la siguiente manera:

<p><u>1er hora:</u></p> <p>0 min. Canulación del animal 1</p> <p>15 min. Canulación del animal 2</p> <p>30 min. Lectura animal 1 en Plus Maze (5 min.)</p> <p>45 min. Lectura animal 2 en Plus Maze (5 min.)</p>	<p><u>2da hora:</u></p> <p>0 min. Canulación del animal 3</p> <p>15 min. Canulación del animal 4</p> <p>30 min. Lectura animal 3 en Plus Maze (5 min.)</p> <p>45 min. Lectura animal 4 en Plus Maze (5 min.)</p>
<p><u>3er hora:</u></p> <p>0 min. Canulación del animal 1</p> <p>15 min. Canulación del animal 2</p> <p>30 min. Lectura animal 1 en Campo Abierto (10 min.)</p> <p>45 min. Lectura animal 2 en Campo Abierto (10 min.)</p>	<p><u>4ta hora:</u></p> <p>0 min. Canulación del animal 3</p> <p>15 min. Canulación del animal 4</p> <p>30 min. Lectura animal 3 en Campo Abierto (10 min.)</p> <p>45 min. Lectura animal 4 en Campo Abierto (10 min.)</p>

Segunda semana: Se realiza una línea base utilizando a los animales del Grupo B. Se les introduce agua utilizando una cánula. 16 ratas para campo abierto y 16 ratas para Pluz Maze. Control intrasujeto (16 horas de trabajo), CAJAS 1-A, 2-A, 3-A y 4-A: Control: 8 ratas ♂ canuladas con H²O

Tercer semana: PLUZ MAZE (4 horas de trabajo) CAJA 5-A y 6-A: **Dosis alta:** 8 ratas ♂ canuladas

con extracto de THC en dosis de 150 mg/kg

<p><u>1er hora:</u></p> <p><u>0 min. Canulación del animal 1</u></p> <p><u>15 min. Canulación del animal 2</u></p> <p><u>30 min. Lectura animal 1 en Plus Maze (5 min.)</u></p> <p><u>45 min. Lectura animal 2 en Plus Maze (5 min.)</u></p>	<p><u>2da hora:</u></p> <p><u>0 min. Canulación del animal 3</u></p> <p><u>15 min. Canulación del animal 4</u></p> <p><u>30 min. Lectura animal 3 en Plus Maze (5 min.)</u></p> <p><u>45 min. Lectura animal 4 en Plus Maze (5 min.)</u></p>
<p><u>3er hora:</u></p> <p><u>0 min. Canulación del animal 5</u></p> <p><u>15 min. Canulación del animal 6</u></p> <p><u>30 min. Lectura animal 5 en Plus Maze (5 min.)</u></p> <p><u>45 min. Lectura animal 6 en Plus Maze (5 min.)</u></p>	<p><u>4ta hora:</u></p> <p><u>0 min. Canulación del animal 7</u></p> <p><u>15 min. Canulación del animal 8</u></p> <p><u>30 min. Lectura animal 7 en Plus Maze (5 min.)</u></p> <p><u>45 min. Lectura animal 8 en Plus Maze (5 min.)</u></p>

Tercer semana: (4 horas de trabajo) PLUZ MAZE CAJA 7-A y 8-A: [©]Dosis efectiva THC + Naloxona: 8 ratas ♂ canuladas con extracto cannabis en dosis efectiva y a los 20min de canuladas, inyectadas intraperitonealmente con Naloxona 10mg/kg. Para este ensayo en particular se necesita de la ayuda de una persona calificada que ayude a inyectar la Naloxona por vía IP.

<p><u>1er hora:</u></p> <p><u>0 min. Canulación del animal 1</u></p>	<p><u>2da hora:</u></p> <p><u>0 min. Canulación del animal 3</u></p>
--	--

[©]La dosis que reportó una variación significativa en los tiempos de reacción con respecto a los controles.

<u>15 min. Canulación del animal 2</u> <u>20 min. Naloxona por vía IP animal 1.</u> <u>30 min. Lectura animal 1 en Plus Maze (5 min.)</u> <u>35 min. Naloxona por vía IP animal 2</u> <u>45 min. Lectura animal 2 en Plus Maze (5 min.)</u>	<u>15 min. Canulación del animal 4</u> <u>20 min. Naloxona por vía IP animal 3.</u> <u>30 min. Lectura animal 3 en Plus Maze (5 min.)</u> <u>35 min. Naloxona por vía IP animal 4</u> <u>45 min. Lectura animal 4 en Plus Maze (5 min.)</u>
<u>3er hora:</u> <u>0 min. Canulación del animal 5</u> <u>15 min. Canulación del animal 6</u> <u>20 min. Naloxona por vía IP animal 5.</u> <u>30 min. Lectura animal 5 en Plus Maze (5 min.)</u> <u>35 min. Naloxona por vía IP animal 6</u> <u>45 min. Lectura animal 6 en Plus Maze (5 min.)</u>	<u>4ta hora:</u> <u>0 min. Canulación del animal 7</u> <u>15 min. Canulación del animal 8</u> <u>20 min. Naloxona por vía IP animal 7.</u> <u>30 min. Lectura animal 7 en Plus Maze (5 min.)</u> <u>35 min. Naloxona por vía IP animal 8</u> <u>45 min. Lectura animal 8 en Plus Maze (5 min.)</u>

Cuarta semana: CAMPO ABIERTO Grupo B (4 horas de trabajo) CAJA 3-A y 4-A: Dosis baja: 8 ratas ♂ canuladas con extracto de THC en dosis de 75 mg/kg

<u>3er hora:</u> 0 min. Canulación del animal 1 15 min. Canulación del animal 2 30 min. Lectura animal 1 en Campo Abierto (10 min.) 45 min. Lectura animal 2 en Campo Abierto (10 min.)	<u>4ta hora:</u> 0 min. Canulación del animal 3 15 min. Canulación del animal 4 30 min. Lectura animal 3 en Campo Abierto (10 min.) 45 min. Lectura animal 4 en Campo Abierto (10 min.)
---	---

<u>3er hora:</u>	<u>4ta hora:</u>
0 min. Canulación del animal 5	0 min. Canulación del animal 7
15 min. Canulación del animal 6	15 min. Canulación del animal 8
30 min. Lectura animal 5 en Campo Abierto (10 min.)	30 min. Lectura animal 7 en Campo Abierto (10 min.)
45 min. Lectura animal 6 en Campo Abierto (10 min.)	45 min. Lectura animal 8 en Campo Abierto (10 min.)

Cuarta semana: CAMPO ABIERTO (4 horas de trabajo) CAJA 5-A y 6-A: **Dosis alta:** 8 ratas ♂ canuladas con extracto de THC en dosis de 150 mg/kg

Cuarta semana: (4 horas de trabajo) CAMPO ABIERTO CAJA 7-A y 8-A: Dosis efectiva THC + Naloxona: 8 ratas ♂ canuladas con extracto de THC en dosis efectiva y a los 20min de canuladas, inyectadas intraperitonealmente con Naloxona 10mg/kg.

Quinta Semana: Grupo A. Tail Flick. Curva de efectividad.

Día 1. Se inicia la curva del Tail Flick con el Grupo A + 3. (6 horas de trabajo)

Los animales “reciclados” en la primera fase se utilizan para la curva. La curva se hace con 5 grupos de 7 ratas macho cada uno. Se utiliza la dosis con la que en las dos pruebas anteriores (Plus Maze y Campo Abierto) se obtuvo un visible cambio conductual. Otra opción es usar una dosis media entre la dosis alta y la dosis baja.

Primer punto	Segundo punto	Tercer punto	Cuarto punto	Quinto punto
18 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos

El propósito de la curva es encontrar el punto de la analgesia, en especial si luego se va a emplear un antagonista de la vía clásica, como lo es la naloxona.

Primer Punto (Inversión de T= 30 minutos)

Se canulan 7 ratas en intervalos de tiempo de dos minutos y medio cada una (2' 30").

Cuando se termina de canular la última rata, se inicia la lectura de la primer rata canulada. Se procede de igual manera en cada uno de los puntos correspondientes, respetando los tiempos.

Tail Flick Pruebas de Analgesia. Grupo B.

Día 3. Dosis Media: Se administra con una cánula por vía oral a una dosis de 75mg/kg, basándose en las dosis usadas por 8 ratas a intervalos de tiempo de dos minutos y medio cada una (2' 30''). Cuando se termina de canular la última rata, se espera 10 minutos y luego se inicia la lectura de la primer rata canulada.

Dosis Alta: Se canulan 8 ratas con una dosis de 150mg/kg a intervalos de tiempo de dos minutos y medio cada una (2' 30''). Cuando se termina de canular la última rata, se espera 10 minutos y luego se inicia la lectura de la primer rata canulada.

Día 4. Grupo Control: Se canulan con agua 8 ratas a intervalos de tiempo de dos minutos y medio cada una (2' 30''). Cuando se termina de canular la última rata, se inicia la lectura de la primer rata canulada.

Inhibición de la Vía Clásica: Para este ensayo en particular se requiere de la ayuda de una persona calificada que ayude a inyectar la Naloxona por vía IP. Se canulan con la dosis que reporta tiempos de reacción más largos (un mejor efecto analgésico) 8 ratas a intervalos de tiempo de dos minutos y medio cada una (2' 30''). Cuando se termina de canular la última rata, se le inyecta Naloxona a la primer rata y luego se inicia la lectura de la primer rata canulada.

11.- Proporcione la lista del personal técnico y profesional a cargo de los distintos procedimientos experimentales e indique la experiencia individual

Nombre	Procedimiento a cargo	Adiestramiento y años de experiencia
Jonatan Perez Rocha	Canulacion intragastrica (vía oral)	Modulo I a IV del LEBi
Jonatan Perez Rocha	Campo abierto (open field)	Modulo V y VI de LEBi
Jonatan Perez Rocha	Laberinto elevado en cruz (plus maze)	Laboratorio Bases Biolog.
Jonatan Perez Rocha	Tail flick (placa caliente)	Asist. Dto. Farmacología.
Beatriz Badilla Baltodano	Eutanasia y otras vías administración.	Prof. Farmacología UCR.

12.a.- Describa las instalaciones o jaulas . Llene los espacios claros.(Sección VI de la Guía)

	Instalaciones	Jaula
Iluminación	Natural y bombillo rojo x las noches	Cajas 15 x 25 pulgadas aprox.
Reciclaje de aire	Óptimos.	Cierre dorsal con tapa de Rejillas en acero inoxidable. Cajas de polímero no toxico Prestadas por la Fac. de Farmacia de la UCR.
Temperatura	19 – 30 grados Celsius.	
Humedad	Óptimos.	
Dimensiones	Del Laboratorio $\geq 75m^2$	
Frecuencia de aseo	Dos veces por día.	

12.b.- Se estimula a los animales?

Si (De qué manera?)

No:

12.c.-Describa los protocolos de alimentación y mantenimiento general durante el experimento.

Restricción de alimentos y agua una hora antes de cada procedimiento.

Alimentación y suministro de agua 2 veces por día: al medio día y tras los experimentos.

13. Durante el periodo de experimentación serán los animales ejercitados?

Con qué frecuencia? Explique.

Si (Explique en qué forma)

No (Explique por qué)

El ensayo es de tipo agudo, los animales serán utilizados en el periodo que va de las 5pm a las 9 pm (que inician su actividad). Al finalizar todos los experimentos, los mismos serán devueltos al LEBi, para que dispongan de ellos, o para su respectiva Eutanacia.

14.-.- Además de procedimientos quirúrgicos, de represión o de comportamiento, hay

algún procedimiento o factores que puedan causar sufrimiento, ansiedad o

incomodidad a los animales? Si

No

En caso afirmativo, describa que exámenes físicos, pruebas de laboratorio o precondicionamiento al equipo se requerirán..

III.- PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS

Proporcione la siguiente información si se aplica a su proyecto (Si no se aplica, pasar al apartado IV)

- 1.- Describa los cuidados preoperatorios incluyendo exámenes físicos, pruebas de laboratorio, acondicionamiento de aparatos, medicamentos y anestesia (dosis, ruta, frecuencia). En caso necesario, puede copiar los cuadros de los puntos 2 ó 3.

N/A

- 2- Se utilizarán drogas relajantes o paralíticas? Si No

En caso afirmativo indique nombre comercial, principio activo, dosis/frecuencia y vía de administración. Justifique y describa los efectos.

Nombre comercial	Principio Activo	Dosis/frecuencia	Vía
Justificación y Descripción de Efectos :			

- 3.- Haga una lista de la medicación post-operatoria (analgésicos, antibióticos), indicando nombre comercial, principio activo, dosis/frecuencia y vía de administración.

Medicamento	Dosis	Ruta	Frecuencia

4.- Describa en detalle los cuidados post-operatorios planeados.

5.- Serán los mismos animales sometidos a cirugía o intervenciones adicionales después de una primera operación? Sí No

En caso afirmativo, justifique el procedimiento. Por regla general, no son aceptados procedimientos quirúrgicos múltiples en un mismo animal.

IV.- RESTRICCIÓN FÍSICA PROLONGADA:

Proporcione la siguiente información si se aplica a su proyecto:

1.- Explique la razón de usar restricción física o inducción de estrés.

2.- Describa en detalle el equipo, método y períodos de restricción o estrés y la frecuencia de observación.

3.- Nombre y experiencia del personal que realizará el procedimiento.

Nombre	Procedimiento a su cargo	Años de adiestramien

4.- Se inducirá dolor? Sí No Describa :

En uno de los Ensayos (Test), la placa caliente (tail flick) se les aplicara calor no mayor a 70 grados celcius en el primer tercio de la cola iniciando por su base.

5.- Se usará estimulación eléctrica, de luz, sonido, u otra para modificar la conducta del animal? Sí No Describa :

6.- Serán los animales sujetos a ayunos o a dietas deficitarias en uno o más nutrientes?

Sí No

En caso afirmativo, describa, tiempo, cómo será determinado el bienestar general de los animales y con qué frecuencia serán pesados?

Declaro que la información dada es veraz y cierta, y firmo bajo fe de juramento.

Nombre Investigador Principal	Cédula	Cargo	Fax	Teléfono
Jonatan Perez Rocha	602730855	Tesario	2511 8350	8897 5937

Firma: _____

Lugar

Fecha

REVISION DEL COMITE

Fecha:

Nombre:

Firma:

	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>

La presente solicitud

Fue aprobada en su versión original

Fue aprobada en una versión modificada

No fue aprobada

Es necesaria mayor información / estudio.

Comentarios:

PROTECCIÓN A ANIMALES

Ley No 7451

LA ASAMBLEA LEGISLATIVA DE LA REPUBLICA DE COSTA RICA

DECRETA :

BIENESTAR DE LOS ANIMALES

CAPITULO 1

Disposiciones generales

ARTÍCULO 1.- Valores

.La familia y las instituciones educativas fomentarán, en niños y jóvenes, los valores que sustentan esta Ley. De manera particular se enfatizará en los siguientes :

- a) La conciencia de que los actos crueles y de maltrato contra los animales lesionan la dignidad humana.
- b) El fomento del respeto por todos los seres vivos.
- c) La conciencia de que la compasión por los animales que sufren dignifica al ser humano.
- d) El conocimiento y la práctica de las normas que rigen la protección de los animales.

ARTÍCULO 2.- Ambito de competencia

Los animales gozarán de los beneficios estipulados en esta Ley y su Reglamento.

CAPÍTULO II

Bienestar de los animales

ARTÍCULO 3 :- Condiciones básicas

Las condiciones básicas para el bienestar de los animales son las siguientes :

- a) Satisfacción del hambre y la sed.
- b) Posibilidad de desenvolverse según sus patrones normales de comportamiento.
- c) Muerte provocada sin dolor y, de ser posible, bajo supervisión profesional.
- d) Ausencia de malestar físico y dolor.
- e) Preservación y tratamiento de las enfermedades.

ARTÍCULO 4 :- Trato a los animales silvestres

Los animales silvestres deberán gozar, en su medio, de una vida libre y tener la posibilidad de reproducirse. La privación de su libertad, con fines educativos, experimentales o comerciales, deberá producirles el mínimo daño posible y estar acorde con la legislación vigente, sin perjuicio de lo dispuesto en la Ley de conservación de la vida silvestre No 7317 del 30 de octubre de 1992.

ARTÍCULO 5 :- Trato a los animales productivos

El propietario o el poseedor de animales productivos deberá velar porque vivan, crezcan y se desarrollen en un ambiente apropiado.

Cuando el hombre modifique el ambiente, además de procurar la productividad, deberá tomar en cuenta el bienestar y las condiciones apropiadas de vida de estos animales.

Asimismo, deberá cuidar que los animales productivos que se destinen al consumo humano sean transportados en condiciones convenientes. Deberán sacrificarse con la tecnología adecuada, según la especie, para reducirles el dolor al mínimo.

ARTÍCULO 6 :- Trato a los animales de trabajo

Los animales de trabajo deberán recibir buen trato, contar con el reposo necesario y una alimentación reparadora, conforme a la labor que realicen.

ARTÍCULO 7 :- Trato a los animales mascota

Los dueños de animales mascota están obligados a garantizarles condiciones vitales básicas.

ARTÍCULO 8 :- Trato a los animales de exhibición

Los animales de los zoológicos deberán exhibirse, alimentarse y mantenerse en las condiciones adecuadas a cada especie.

ARTÍCULO 9 :- Trato a los animales para deportes

Los animales utilizados para deportes no deberán someterse a la disciplina respectiva bajo el efecto de ninguna droga o medicamento perjudicial para la salud e integridad ; tampoco deberán ser forzados más allá de su capacidad.

CAPITULO III

Experimento con animales

ARTÍCULO 10 :- Experimentos

En los experimentos con animales, el investigador deberá velar porque se cumpla con lo siguiente :

- a) Antes de la experimentación, deberá ponderarse si el experimento beneficia la salud humana, la animal o el progreso de los conocimientos biológicos.
- b) Los animales seleccionados deberán ser de la especie adecuada y su número no deberá exceder el mínimo necesario para obtener resultados científicamente válidos.
- c) Los investigadores y el resto del personal deberán tratar a los animales con atención y cuidado, evitándoles o reduciéndoles el dolor al mínimo.
- d) Antes de la manipulación de un animal que pueda resultar dolorosa, deberá brindársele sedación, analgesia o anestesia, según las prácticas veterinarias aceptadas.
- e) Al final del experimento o durante él, si es necesario, se le dará muerte sin dolor al animal que, de quedar con vida, padecería dolores agudos o crónicos, trastornos, molestias o discapacidades irreversibles.
- f) Los animales sometidos a experimentos deberán mantenerse en condiciones vitales óptimas. Los bioterios serán regentados por personal capacitado en la materia. Siempre que se necesite, se procurará brindarles atención medico veterinaria.
- g) El responsable de toda institución, pública o privada, que utilice animales para experimentos, deberá cerciorarse de que los investigadores posean la experiencia necesaria para realizarlos. En la medida de lo posible, deberán ofrecer oportunidades de formación a los investigadores, para conducir adecuadamente esos experimentos.

ARTÍCULO 11 :- Experimentación alternativa

Antes de utilizar un animal para la experimentación deberán intentarse, siempre que sean apropiados, otros métodos, como los basados en modelos matemáticos, la simulación por computador y el empleo de sistemas biológicos in vitro.

Siempre que el experimento y las condiciones lo permitan, se utilizarán animales del nivel más bajo posible en la escala zoológica.

ARTÍCULO 12 :- Condiciones para los experimentos

Los experimentos con animales deberán registrarse en el Ministerio de Ciencia y Tecnología, salvo los casos estipulados en la Ley de conservación de vida silvestre No. 7317, del 30 de octubre de 1992.

Ese Ministerio vigilará porque tales investigaciones se realicen de acuerdo con los criterios establecidos en esta Ley.

ARTÍCULO 13 :- Experimentos ilegales

Los experimentos que no se ajusten a la presente Ley y su Reglamento, podrán ser denunciadas por cualquier persona, física o jurídica, ante el Ministerio de Ciencia y Tecnología, a fin de que se suspendan. No podrán reiniciarse hasta que el responsable ofrezca las garantías del caso a ese Ministerio.

CAPITULO IV

Obligaciones de los propietarios o poseedores de animales

ARTÍCULO 14 :- Responsables

Los propietarios o poseedores de animales serán los responsables de velar porque se beneficien con la aplicación de las condiciones básicas dictadas en esta Ley.

ARTÍCULO 15 :- Prohibiciones

Se prohíbe la cría, la hibridación y el adiestramiento de animales con el propósito de aumentar su peligrosidad.

Asimismo, se prohíbe que los responsables de animales de cualquier especie promuevan peleas entre ellos.

ARTÍCULO 16 :- Medidas veterinarias obligatorias

Los propietarios o los poseedores de animales deberán cumplir con las medidas veterinarias declaradas de acatamiento obligatorio, de conformidad con los artículos 184 y siguientes de la Ley General de Salud No. 5395, del 30 de octubre de 1973 y sus reformas.

ARTÍCULO 17 :- Trato a los animales peligrosos

Los propietarios o los poseedores de animales peligrosos deberán mantenerlos en condiciones adecuadas de salubridad y seguridad, que eviten los riesgos para la salud y la seguridad de las personas. De incumplirse con estas condiciones, el Ministerio de Salud les considerará animales nocivos.

CAPÍTULO V

ARTÍCULO 18 :- Determinación de la nocividad

Para efectos de esta Ley, el Ministerio de Salud o el Ministerio de Agricultura y Ganadería determinará cuáles animales se considerarán nocivos. También se incluirán dentro de esta categoría, las mascotas, los animales productivos y los de trabajo que deambulen por vías y sitios públicos.

ARTÍCULO 19 :- Adopción o remate de animales

Las autoridades administrativas deberán llevar los animales mencionados en los dos artículos anteriores a albergues o al fondo municipal para ser adoptados o rematados. En estos casos, se concederá un plazo de tres días hábiles al propietario o al poseedor para reclamar sus derechos. Si quince días hábiles después de vencido ese plazo, no se ha verificado la adopción ni el remate, deberá dárseles muerte sin sufrimiento.

Durante la permanencia en el albergue o el fondo municipal, a los animales deberá brindárseles atención y asistencia médico veterinaria, como se establece en la Ley de regulación de la tenencia y matrícula de perros No. 2391, del 2 de julio de 1959.

ARTÍCULO 20 :- Condiciones de albergues y fondos municipales

En la medida de lo posible, todo albergue o fondo municipal para animales deberá contar con la dirección técnica y científica, que garantice los tratamientos y los cuidados convenientes así como la muerte sin dolor mediante supervisión profesional.

CAPÍTULO VI

Sanciones

ARTÍCULO 21 :- Sujetos de sanción y multas

Se sancionará con una multa equivalente a cuatro salarios mínimos mensuales, a quien :

- a) Propicie peleas entre animales de cualquier especie.
- b) Promueva o realice la cría, la hibridación o el adiestramiento de animales para aumentar su peligrosidad.

También se sancionará, con una multa equivalente a un salario mínimo mensual, a quien :

- c) Viole las disposiciones sobre experimentación estipuladas en el artículo 10 de esta Ley.
- d) Realice experimentos con animales, pero no los registre ante el Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- e) Mantenga un animal peligroso en condiciones inadecuadas, de modo que se arriesgue la seguridad colectiva.

Para los efectos de esta ley, la denominación “salario mínimo” corresponde al monto equivalente al menor salario que contiene el decreto vigente de salarios mínimos.

ARTÍCULO 22 :- Responsabilidades civiles

Al propietario o poseedor le corresponden las responsabilidades civiles por los daños y perjuicios causados por el animal bajo su vigilancia y cuidado, conforme a lo dispuesto en los artículos 1045, 1046 y 1048 del Código Civil.

CAPÍTULO VII

Disposiciones finales

ARTÍCULO 23 :- Deberes de la administración pública

Por medio de sus dependencias técnicas competentes, la administración pública determinará si no se le brindan a un animal las condiciones básicas establecidas en la Ley. Además, deberá oír a las organizaciones protectoras de animales, cuando formulen denuncias.

ARTÍCULO 24 :- Reglamentación

El Poder Ejecutivo reglamentará la presente Ley en un plazo máximo de sesenta días a partir de su publicación

ARTÍCULO 25 :- Vigencia

Rige a partir de su publicación

COMISIÓN LEGISLATIVA PLENA PRIMERA. Aprobado el anterior proyecto el día veintiséis de octubre de mil novecientos noventa y cuatro.

Sandra Pizsk Feinzilber, Presidenta.- Alvaro Azofeifa Astúa, Secretario

ASAMBLEA LEGISLATIVA.- San José, a los tres días del mes de noviembre de mil novecientos noventa y cuatro.

Comuníquese al Poder Ejecutivo

Alberto F. Cañas, Presidente,-- Juan Luís Jiménez Succar, Primer Secretario.- Mario A. Alvarez G., Segundo Secretario.

Dado en la Presidencia de la República.- San José, a los diecisiete días del mes de noviembre de mil novecientos noventa y cuatro.

Ejecútese y publíquese

JOSE MARÍA FIGUERES OLSEN.--. Los Ministros de Salud, Herman Weinstok W. Y de Agricultura y Ganadería, Mario Carvajal Herrera.—I a-C-220.—(55829)

DECRETO No. 26668 - MICIT

EL PRESIDENTE DE LA REPUBLICA

Y EL MINISTRO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

EN USO DE LAS ATRIBUCIONES QUE LES CONFIERE EL ARTICULO 140 DE LA CONSTITUCION POLITICA EN SUS INCISOS 3) Y 18); Y CON FUNDAMENTO EN LA “LEY DE PROMOCION DEL DESARROLLO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO” NUMERO 7169, DEL 26 DE JUNIO DE 1990, Y LA “LEY DE BIENESTAR DE LOS ANIMALES” NUMERO 7451 DEL 13 DE DICIEMBRE DE 1994,

CONSIDERANDO:

propósito de conservar para las futuras generaciones los recursos naturales del país y garantizarle al costarricense una mejor calidad de vida y bienestar así como un mejor conocimiento de sí mismo y de la sociedad .

2° __Que en este sentido, la habilidad de científicos biomédicos para aumentar el bienestar del hombre y de los animales, depende directamente de los avances realizados gracias a la investigación, mucha de la cual requiere el uso de animales de experimentación.

3° __Que en general, los experimentos con animales han jugado un papel crucial en el desarrollo de los modernos tratamientos médicos.

4° __Que por otra parte, aunque la investigación siempre ha demandado condiciones de libertad por lo que requiere un alto grado de autonomía para que el científico siga líneas de investigación específicas e independientes, esta libertad no da licencia para pasar por alto patrones éticos elementales, además de las razones técnicas dirigidas a asegurar una experimentación confiable y reproducible.

5° __Que de acuerdo a la “Ley de Bienestar de los Animales” numero 7451 del trece de diciembre de mil novecientos noventa y cuatro, corresponde al Ministerio de Ciencia y Tecnología el velar por el cumplimiento de las disposiciones contenidas en esta ley, específicamente a lo referido a animales de experimentación.

Por tanto,

DECRETAN:

REGLAMENTO A LOS ARTICULOS 3, 10,11,12 Y 13 DE LA LEY NUMERO 7451 “BIENESTAR DE LOS ANIMALES”

ARTICULO 1° ___ Toda actividad científica o tecnológica que se realice en el territorio nacional en la que se utilicen de una u otra forma animales vivos, deberán registrarse en el Ministerio de Ciencia y Tecnología, llenando el formulario que al efecto se entregara en las oficinas de dicha institución denominado “FORMULARIO DE REGISTRO PARA UTILIZACION DE ANIMALES DE LABORATORIO”. Se exceptúan los casos estipulados en la ley de conservación de vida silvestre numero 7317 del 30 de octubre de mil novecientos noventa y dos.

ARTICULO 2° ___ Respecto de las condiciones básicas, así como las demás que han de tenerse en cuenta para la experimentación con animales, los investigadores deberán acatar lo establecido en la “GUIA PARA EL CUIDO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO”, la cual desarrolla las disposiciones establecidas en la ley 7451, y junto con estas, serán de acatamiento obligatorio para los investigadores que hagan uso de animales en sus experimentos. Dicha guía será entregada junto con el formulario de registro.

ARTICULO 3° ___ Se crea el Comité Técnico Nacional Sobre la Utilización de Animales de Laboratorio, el cual funcionara como órgano consultivo técnico del Ministerio de Ciencia y Tecnología en materia de fiscalización e investigación de denuncias presentadas ante este Ministerio.

ARTICULO 4° ___ El Comité estará integrado de la siguiente manera:

- a) Un representante del Ministerio de Ciencia y Tecnología, quien preside.
- b) Un representante de la Sociedad Mundial para la Protección Animal (WSPA).
- c) Un representante de la Asociación Centroamericana, del Caribe y Mexicana de Animales de Laboratorio de Costa Rica (ACCMAL)

Los miembros serán designados por los respectivos organismos y sus funciones serán, entre otras, la de asesorar al Ministerio de Ciencia y Tecnología en la materia, emitir dictámenes técnicos, colaborar en la fiscalización de todas las actividades registradas, mantener informado al Ministerio de los cambios que a nivel internacional se susciten respecto del uso y cuidado de los animales de laboratorio, principalmente aquellos tendientes a los usos alternativos.

ARTICULO 5° ___El Ministerio llevara a cabo inspecciones periódicas para verificar el cumplimiento de las disposiciones incluidas en la Guía. En caso de detectarse alguna anomalía o de comprobarse el incumplimiento de una disposición, se procederá a la suspensión temporal del experimento, todo de conformidad con las leyes aplicables.

ARTICULO 6° ___El Ministerio llevara un registro de todos los experimentos que sean presentados, así como una base de datos en la que consten las fechas de inicio y vencimiento, las posibles denuncias que se presenten en contra de un proyecto, además de todos los demás datos que sean necesarios para verificar las condiciones requeridas por la ley 7451, este reglamento y la guía. El Ministro deberá designar al funcionario que estará a cargo de dicho registro.

ARTICULO 7° ___Respecto al establecimiento de sanciones, estas deberán imponerse respetando los procedimientos establecidos en la Ley General de la Administración Pública.

ARTICULO 8° ___Rige a partir de su publicación.

Dado en la Presidencia de la República. ___ San José, a los diecinueve días del mes de enero de mil novecientos noventa y ocho.

Publíquese. ___ RODRIGO OREAMUNO BLANCO. ___Eduardo Sibaja Arias, Ministro de Ciencia y Tecnología a.i.

GUÍA PARA EL MANEJO DE ANIMALES DE LABORATORIO

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	4
II. POLÍTICAS Y RESPONSABILIDADES INSTITUCIONALES	4
III. MONITOREO DEL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES	4
IV. PROTOCOLOS PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES	5
IV.1 Sujeción física	6
IV.2 Restricción de alimento o fluido	7
IV.3 Características y entrenamiento del personal	7
V. SALUD OCUPACIONAL Y SEGURIDAD DEL PERSONAL	8
V.1 Entrenamiento	8
V.2 Higiene personal	8
V.3 Instalaciones, procedimientos y monitoreo	9
V.4 Experimentación animal con agentes de riesgo	9
V.5 Protección del personal	10
V.6 Evaluación médica y medicina preventiva para el personal	11
VI. AMBIENTE ANIMAL, ALBERGUE Y MANEJO	11
VI.1 Recinto primario	12
VI.1.a Recomendaciones de espacio	14
VI.2 Temperatura y humedad	14
VI.3 Ventilación	17

VI.4	Iluminación	18
VI.5	Ruido	18
VII.	MANEJO DE LA CONDUCTA	19
VII.1	Ambiente estructural	19
VII.2	Ambiente social	19
VII.3	Actividad	20
VIII.	CRIANZA	20
VIII.1	Alimento	20
VIII.2	Agua	21
VIII.3	Cama	22
VIII.4	Saneamiento	22
VIII.4.a	Cambio de cama	22
VIII.4.b	Limpieza y desinfección de recintos primarios	23
VIII.4.c	Limpieza y desinfección de recintos secundarios	24
VIII.4.d	Monitoreo de la efectividad del saneamiento	25
VIII.5	Eliminación de desechos	25
VIII.6	Control de plagas	26
VIII.7	Cuido durante feriados, fines de semana y emergencias	26
IX .	MANEJO DE LA POBLACIÓN	26
IX.1	Identificación y registros	26
IX.2	Genética	27
IX.3	Cuidado médico veterinario	27
IX.4	Obtención y transporte de los animales	28
IX.5	Medicina preventiva	28
IX.6	Cuarentena, estabilización y separación	28

IX.7 Inspección, diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades.	29
X. CIRUGÍA	29
XI. DOLOR, ANALGESIA Y ANESTESIA	31
XII. EUTANASIA	32
XIII. PLANTA FÍSICA	32
XIII.1 Áreas funcionales	33
XIII.2 Lineamientos de construcción	34
XIII.2.a Corredores	34
XIII.2.b Puertas de los cuartos de animales	34
XIII.2.c Ventanas exteriores	34
XIII.2.d Pisos	35
XIII.2.e Drenaje	35
XIII.2.f Paredes	35
XIII.2.g Techos	35
XIII.2.h Ventilación y aire acondicionado	36
XIII.2.i Energía e iluminación	36
XIII.2.j Áreas de almacenamiento	36
XIII.2.k Control de ruido	37
XIII.2.l Instalaciones para materiales de limpieza	37

I. INTRODUCCIÓN

Esta guía está deliberadamente escrita en términos generales de manera que sus recomendaciones pueden aplicarse en las diversas instituciones y situaciones que producen o usan animales para la investigación, enseñanza y ensayos. En un documento de este tipo son imperativas las generalizaciones y las recomendaciones amplias. Esta perspectiva requiere que los usuarios, científicos y productores usen el juicio profesional para adoptar decisiones específicas respecto al cuidado y uso de los animales.

En general, los principios estipulan responsabilidades para los investigadores cuyas actividades están sujetas a revisión por parte de un comité institucional para el cuidado y uso de los animales (CICUA). Esta guía está escrita en términos generales por lo que los CICUA tienen un papel central en la interpretación, revisión y evaluación de los programas institucionales para el cuidado y uso de los animales.

II. POLÍTICAS Y RESPONSABILIDADES INSTITUCIONALES.

Para implementar efectivamente las recomendaciones de esta guía debe establecerse un comité institucional para el cuidado y uso de los animales (CICUA) que revisará y evaluará los programas de investigación, ensayos y educacionales.

III. MONITOREO DEL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES

Es responsabilidad de cada institución proveer orientación, materiales de apoyo, acceso a recursos apropiados y, si es necesario, entrenamiento específico para auxiliar a los miembros del CICUA en la comprensión y evaluación de los asuntos sometidos al comité.

Los miembros del CICUA deben llenar los siguientes requisitos:

Un profesional certificado, con entrenamiento o experiencia en la ciencia y medicina de animales de laboratorio o en el uso de las especies en cuestión.

Al menos un científico experimentado en investigación con animales.

Al menos un miembro público que represente los intereses de la comunidad general en el cuidado y uso apropiados de los animales. Estos miembros no deberían ser usuarios de animales de laboratorio, estar afiliados con la institución o ser miembros de la familia inmediata de alguna persona afiliada con la institución.

Las funciones del CICUA incluyen inspección de instalaciones, evaluación de programas y áreas para actividad animal, presentación de reportes a los oficiales responsables de la institución, revisión del uso propuesto de animales en investigación, ensayos, o educación y establecimiento de mecanismos para recibir y revisar lo concerniente al cuidado y uso de animales en la institución.

El CICUA debe reunirse al menos cada seis meses y deben mantenerse los registros de las reuniones del comité. El comité debe revisar el programa de cuidado animal e inspeccionar las instalaciones y áreas activas al menos cada seis meses. Después de la revisión e inspección debe enviarse un reporte escrito firmado por la mayoría del CICUA al responsable administrativo de la institución acerca del estado del programa sobre cuidado y uso animal y otras actividades relacionadas.

IV. PROTOCOLOS PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES

Deben tomarse en cuenta los siguientes tópicos en la preparación y revisión de los protocolos para el cuidado y uso de los animales:

-Razonamiento y propósito del uso que se dará a los animales.

-Justificación de la especie y número de animales requerido;

siempre que sea posible, el número debe justificarse estadísticamente.

-Disponibilidad y conveniencia del uso de procedimientos menos invasivos, otras especies, preparación de órgano aislado, cultivo de células o tejidos o simulación por computadora.

-Calidad de entrenamiento y experiencia del personal en los

procedimientos usados.

- Requerimientos de crianza y albergue inusuales.
- Sedación, analgesia y anestesia apropiadas. Las escalas de dolor o invasividad pueden ayudar en la preparación y revisión de los protocolos.
- Duplicación innecesaria de experimentos.
- Realización de múltiples procedimientos operativos.
- Criterio y procedimiento para la programación de intervención, remoción de animales de un estudio, o eutanasia si se anticipa dolor o estrés.
- Cuidado postprocedimiento.
- Método de eutanasia o disposición del animal.
- Seguridad del ambiente de trabajo para el personal.

Ocasionalmente, los protocolos incluyen procedimientos que no se han establecido previamente o que tienen el potencial de causar dolor o estrés que no se puede controlar adecuadamente. Tales procedimientos deben especificar: sujeción física, cirugías a realizar, restricción de alimento o de fluido, uso de adyuvantes, uso de la muerte como punto final, uso de estímulos nocivos, pruebas de irritación dérmica o corneal, sangrado intracardiaco o del seno orbital, o el uso de condiciones ambientales anormales. La información objetiva relevante relacionada con los procedimientos y propósitos del estudio deben buscarse en la literatura, veterinarios, investigadores y otros conocedores del efecto en los animales.

Si se sabe poco acerca de un procedimiento específico debe diseñarse un estudio piloto limitado bajo la revisión del CICUA para indagar los efectos del procedimiento en los animales.

IV.1. Sujeción física.

Las siguientes son guías importantes para la sujeción:

- Los aparatos de sujeción no deben considerarse métodos

normales de albergue.

- Los aparatos de sujeción no deben usarse simplemente como conveniencia en el manejo de los animales.
- El período de sujeción debe ser el mínimo requerido para alcanzar los objetivos de la investigación.
- Los animales a ser ubicados en los aparatos de sujeción deben ser entrenados para adaptarse al equipo y al personal.
- Debe observarse al animal a intervalos apropiados, según lo determina el CICUA.
- Debe proveerse cuidado veterinario si se observan lesiones o enfermedad asociadas con la sujeción. La presencia de lesiones, enfermedad o cambios en la conducta frecuentemente necesita remover temporal o permanentemente al animal de la sujeción.

IV. 2. Restricción de alimento o fluido.

Cuando las situaciones experimentales requieran restricción de alimento o fluido, debe haber disponibles mínimas cantidades de alimento y fluido para permitir el desarrollo de animales jóvenes y para mantener el bienestar a largo plazo de todos los animales. La restricción para propósitos de investigación debe estar científicamente justificada y debe establecerse un programa para monitorear los índices fisiológicos o de conducta, incluyendo criterios (como pérdida de peso o estado de hidratación) para remover temporal o permanente un animal del protocolo experimental. Típicamente la restricción se mide como el porcentaje del consumo diario normal o ad libitum o como el cambio porcentual en el peso corporal del animal.

Deben tomarse precauciones en el caso de restricciones de fluido para evitar deshidratación aguda o crónica, por ejemplo registro diario de consumo de fluido y registro de peso corporal al menos una vez a la semana, o más frecuentemente, según se necesite para animales pequeños como roedores. Debe darse especial atención para asegurarse que los animales consumen una dieta balanceada porque el consumo de alimento disminuye con la restricción de fluido. Debe

usarse la menor restricción que permita alcanzar los objetivos científicos. En el caso de protocolos de investigación de respuesta condicionada se recomienda el uso de alimento o fluido altamente preferido como refuerzo positivo en lugar de la restricción.

IV. 3. Características y entrenamiento del personal.

La cantidad y características del personal requerido para conducir y apoyar un programa de cuidado y uso animal depende de varios factores, como el tipo y tamaño de la institución, la estructura administrativa para proveer un cuidado animal adecuado, las características de la planta física, el número y especies de animales mantenidos y la naturaleza de la investigación, prueba y actividades educativas.

El personal que usa o cuida los animales debe participar regularmente en actividades de educación continua relevantes para sus responsabilidades.

V. SALUD OCUPACIONAL Y SEGURIDAD DEL PERSONAL

V.1. Entrenamiento.

El personal debe entrenarse respecto a zoonosis, seguridad química, peligros microbiológicos y físicos (incluyendo los relacionados con radiación y alergias), condiciones inusuales o agentes que puedan ser parte de los procedimientos experimentales (incluyendo el uso de animales modificados genéticamente y el uso de tejidos humanos en animales inmunocomprometidos), manejo de materiales de desecho, higiene personal y otras consideraciones (precauciones durante el embarazo, enfermedad o inmunocompetencia disminuida del personal)

apropiada al riesgo impuesto por su lugar de trabajo.

V.2. Higiene personal.

Es esencial que todo el personal mantenga un alto estándar de limpieza personal. La ropa disponible para usar en las instalaciones de animales y laboratorios en los que se usan animales

debe ser suministrada y lavada por la institución. En muchas instituciones es aceptable un servicio de lavandería comercial, sin embargo, debe descontaminarse la ropa expuesta a riesgos potenciales. Guantes, mascarillas, cubre cabezas desechables, ropas y cobertores de zapatos son deseables en algunas circunstancias.

El personal debe lavar sus manos y cambiar su ropa tan frecuentemente como sea necesario para mantener la higiene personal. Las prendas usadas en las habitaciones de los animales no deben usarse fuera de las instalaciones. No debe permitirse al personal comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en las habitaciones de animales.

V.3. Instalaciones, procedimientos y monitoreo.

Deben proveerse instalaciones y recursos para mantener un alto estándar de limpieza personal. Debe haber duchas y lavados disponibles. También deben diseñarse, seleccionarse y desarrollarse instalaciones, equipo y procedimientos para proveer operaciones de sonido ergonómico que reduzca el potencial de daño físico del personal (como el que se produce al levantar equipo pesado o animales y el uso de movimientos repetitivos). El equipo de seguridad debe mantenerse en forma apropiada y calibrado rutinariamente.

La selección de sistemas apropiados para albergue de animales requiere conocimiento profesional y depende de la naturaleza de los riesgos en cuestión, los tipos de animales usados y el diseño de los experimentos. Los animales experimentales deben albergarse de manera que el alimento y las camas potencialmente contaminadas, heces y orina puedan manejarse de manera controlada. Deben proveerse instalaciones, equipo y procedimientos apropiados para la eliminación de las camas.

Deben usarse métodos apropiados para asegurarse que la exposición de agentes biológicos, químicos y físicos potencialmente peligrosos no exceda los límites de exposición permisibles.

V.4. Experimentación animal con agentes de riesgo.

Las instituciones deben tener políticas escritas que gobiernen la experimentación con agentes biológicos, químicos y físicos peligrosos. Un proceso de revisión (como el uso de un comité de

revisión) debe desarrollarse para involucrar a las personas en la evaluación de los aspectos de riesgo y seguridad. Deben establecerse programas formales de seguridad formales para controlar los riesgos, determinar las medidas de seguridad necesarias para su control, asegurar que el personal posea el entrenamiento y habilidades necesarias y asegurar que las instalaciones sean adecuadas para conducir el experimento.

Las instalaciones usadas para la experimentación con agentes peligrosos deben estar separadas de otros albergues para animales y áreas de apoyo, laboratorios de investigación y clínicos e instalaciones para el cuidado de pacientes y debe estar identificada apropiadamente, el acceso a ellos debe estar limitado a personal autorizado.

Tales instalaciones deben estar diseñadas y construidas para facilitar la limpieza y mantenimiento de los sistemas mecánicos. Una instalación de doble corredor o sistema de entrada de barrera apropiadamente manejado y usado es un medio efectivo para reducir la contaminación cruzada. Los drenajes del piso deben contener siempre líquido o estar sellados efectivamente por otros medios.

Los agentes peligrosos deben mantenerse dentro del ambiente de estudio. El control del flujo de aire (ej. Usando gabinetes de seguridad biológica) que reduzca el escape de contaminantes es una barrera primaria usada en el manejo y administración de agentes peligrosos y en la realización de necropsias en animales contaminados. Características especiales de las instalaciones, como cierres del aire, presión de aire negativa, filtros de aire y equipo mecánico redundante con interruptor automático, son barreras secundarias para prevenir liberación accidental de agentes peligrosos hacia el exterior.

Debe limitarse la exposición a gases anestésicos lo cual usualmente se logra usando varias técnicas de remoción. Si se usa éter, debe señalizarse apropiadamente y deben usarse equipos y procedimientos que minimicen los riesgos asociados con su explosividad.

V.5. Protección del personal.

Debe proveerse equipo protectivo personal y deben adoptarse otras medidas de seguridad cuando se necesite. El personal para el cuidado de los animales debe usar ropa protectora apropiada diseñada por la institución, así como zapatos o cubre-zapatos y guantes. Siempre que sea

necesario debe suministrarse ropa protectora limpia. Si es apropiado, el personal debe ducharse al abandonar las zonas de animales, procedimientos o áreas de preparación de dosis. La ropa y equipo protector no deben usarse más allá de los límites del área de trabajo con agentes peligrosos o de la instalación para animales. El personal con exposición potencial a agentes peligrosos debe contar con equipo protector apropiado a tales agente. Por ejemplo, el personal expuesto a primates no humanos debe contar con guantes, protectores de brazos, mascarillas y protectores para la cara. Protección para los oídos debe proporcionarse en áreas ruidosas. Debe suministrarse protección respiratoria al personal que labora en áreas con aire contaminado con material particulado o vapores.

V.6. Evaluación médica y medicina preventiva para el personal.

El desarrollo e implementación de un programa de evaluación médica y medicina preventiva debe implicar la participación de profesionales de la salud como médicos y enfermeras en salud ocupacional. Deben considerarse la confidencialidad y otros factores médicos y legales en el contexto de las regulaciones nacionales y locales apropiadas.

Es deseable una evaluación del historial médico de los empleados antes de la asignación al trabajo para identificar riesgos potenciales. Son convenientes evaluaciones médicas periódicas para las personas en algunas categorías de riesgo. Debe adoptarse un plan de inmunización apropiado, es importante inmunizar contra el tétano al personal encargado del cuidado animal, así como rabia y hepatitis-B al personal bajo riesgo. Se recomienda vacunación si la investigación se realiza en enfermedades infecciosas para las cuales se dispone de vacunas efectivas.

VI. AMBIENTE ANIMAL, ALBERGUE Y MANEJO

Los siguientes factores deben tomarse en cuenta para planear ambientes adecuados, albergues, espacios y manejos sociales y físicos:

- Especie y cepa del animal y características individuales como sexo, edad, tamaño, conducta y salud.
- La habilidad de los animales para formar grupos sociales por medio de la visión, olor y posible contacto, ya sea que se mantengan

individualmente o en grupos.

- El diseño y construcción del albergue.
- La disponibilidad de enriquecedores del ambiente.
- Las metas proyectadas y el diseño experimental (es decir, producción, crianza, investigación, ensayos y educación).
- La intensidad de la manipulación animal y la invasividad de los procedimientos.
- La presencia de materiales peligrosos o causantes de enfermedades.

VI.1. Recinto primario.

El recinto primario (usualmente una caja, jaula o establo) provee los límites del ambiente inmediato del animal. Los recintos primarios aceptables:

Permiten que el animal cubra sus necesidades fisiológicas y de conducta, incluyendo orinar y defecar, mantenimiento de la temperatura corporal, ajustes a postura y movimiento normal y, cuando sea indicado, reproducción.

Permiten interacciones sociales específicas y desarrollo de jerarquías dentro y entre recintos.

Hacen posible que los animales se mantengan limpios y secos (consistente con los requerimientos de las especies).

Permiten adecuada ventilación.

Permiten que los animales tengan acceso a comida y agua y permiten fácil llenado, cambio, colocación y limpieza de los utensilios de alimentos y agua.

Proveen un ambiente seguro que impide el escape o atrapamiento accidental de animales o de sus apéndices entre superficies opuestas o por aberturas estructurales.

Están libres de bordes cortantes o proyecciones que puedan dañar a los animales.

Permiten la observación de los animales con mínimo disturbio.

Los recintos primarios deben estar contruidos con materiales que balanceen las necesidades del animal con la habilidad para facilitar la limpieza. Deben tener superficies impenetrables y suaves con mínimos

bordes, ángulos, esquinas y superficies traslapadas de manera que se reduzca la acumulación de polvo, residuos y humedad y que sea posible la limpieza y desinfección satisfactorias. Deben construirse

con materiales durables que resistan corrosión y manipulación sin astillarse, agrietarse o herrumbrarse.

Materiales menos durables, como la madera, pueden proveer un ambiente más apropiado en algunas situaciones y pueden usarse para construir perchas, estructuras para escalar, áreas de reposo y cercas de perímetro para recintos primarios. Los artículos de madera necesitan reemplazarse periódicamente por daños o dificultades con la limpieza.

Todos los recintos primarios deben mantenerse en buenas condiciones para evitar escape o daño en los animales, lograr comodidad física y facilitar la limpieza. Equipo herrumbrado u oxidado que amenace la salud o seguridad de los animales debe repararse o reemplazarse.

Algunos sistemas de albergue tienen equipos de jaulas y ventilación especiales, incluyendo jaulas con filtros, jaulas ventiladas, aisladores y cubículos. Generalmente el propósito de estos sistemas es minimizar la dispersión de los agentes patógenos aéreos entre jaulas. Frecuentemente requieren diferentes prácticas de crianza como alteraciones en la frecuencia de cambios de cama, uso de técnicas asépticas de manipulación, limpieza y desinfección especializada o regímenes de esterilización para evitar transmisión microbial.

Usualmente los roedores se albergan en jaulas con pisos de alambre lo cual mejora el aseo al permitir el paso de heces y orina hacia una bandeja de recolección. Sin embargo, se ha sugerido que es mejor el empleo de pisos sólidos con camas.

Para otras especies como perros y primates se usan pisos forrados de vinil. El CICUA debe revisar este aspecto para asegurar que el bienestar de los animales sea consistente con el buen saneamiento y los requerimientos del proyecto de investigación.

VI.1.a. Recomendaciones de espacio.

La distribución del espacio debe revisarse y modificarse según se necesite para cubrir las situaciones de albergue individual y las necesidades del animal (por ej. para cuidado pre y postnatal, animales obesos y albergue en grupo o individual).

La calidad del albergue puede determinarse con índices como salud, reproducción, crecimiento, conducta, actividad y uso del espacio. Al menos, el animal debe tener acceso a agua y comida y debe tener suficiente cama limpia o área no obstruida para moverse y descansar.

Siempre que sea apropiado, los animales sociales deben albergarse en pares o grupos más que individualmente, suponiendo que ello no está contraindicado por el protocolo en cuestión y no implica un riesgo a los animales. Dependiendo de una variedad de factores ambientales y de conducta los animales en grupos pueden necesitar mayor o menor espacio total por animal que individualmente.

El cuadro 2.1 indica el espacio recomendado para los roedores de laboratorio más comunes albergados en grupo. Si se albergan individualmente o pesan más de lo indicado en el cuadro necesitarán más espacio. El 2.2 indica el espacio recomendado para otros animales comunes de laboratorio.

VI.2. Temperatura y humedad.

La temperatura ambiental y la humedad relativa pueden depender del diseño de crianza y albergue y pueden diferir considerablemente entre el recinto primario y secundario. Los factores que contribuyen a la variación en temperatura y humedad incluyen el material del albergue y construcción, uso de filtros, número de animales por caja, ventilación forzada de los recintos, frecuencia de los cambios de cama y tipo de encamado.

En ausencia de estudios bien controlados el juicio y experiencia profesionales recomiendan temperaturas de bulbo seco (cuadro 2.3) para varias especies comunes. En caso de animales en espacios confinados el rango de fluctuaciones diarias de temperatura debe mantenerse al mínimo para evitar grandes demandas de los procesos de conducta y metabólicos del animal para compensar cambios en el ambiente térmico. La humedad relativa también debe controlarse pero no tan estrechamente como la temperatura; el rango aceptable de humedad está entre 30% y 70%.

CUADRO 2.1

ESPACIO RECOMENDADO PARA LOS ROEDORES DE LABORATORIOS MAS USADOS ALBERGADOS EN GRUPO

ANIMAL	PESO g.	ÁREA DE PISO/ANIMAL cm ² .	ALTURA cm ² .
Ratón	menos de 10	38.7	12.7
	hasta 15	51.6	12.7
	hasta 25	77.4	12.7
	más de 25	96.8 o más	12.7
Ratas	menos de 100	109.7	17.8

	hasta 200	148.4	17.8
	hasta 300	187.1	17.8
	hasta 400	258	17.8
	hasta 500	387	17.8
	más de 500	451.5 o más	17.8
Hámsters	menos de 60	64.5	15.2
	hasta 80	83.8	15.2
	hasta 100	103.20	15.2
	más de 100	122.6 o más	15.2
Cobayos	menos /o igual a 387 350		17.8
	más de 350	651.4 o más	17.8

CUADRO 2.2**ESPACIO RECOMENDADO PARA CONEJOS, GATOS,****PERROS, PRIMATES Y AVES**

ANIMAL	PESO Kg.	ÁREA DE PISO/ANIMAL m²	ALTURA cm².
Conejos	menos de 2	0.14	35.6
	hasta 4	0.27	35.6
	hasta 5.4	0.36	35.6
	más de 5.4	0.45 o más	35.6
Gatos	menos o igual a 4	0.27	61.0
	más de 4	0.36 o más	61.0
Perros (1)	menos de 15	0.72	-
	hasta 30	1.08	-
	más de 30	2.16 o más 2.17	-
Palomas (2)	-	0.072	-
Codornices (2)	-	0.022	-
Gallinas (2)	menos de 0.25	0.022	-
	hasta 0.5	0.045	-
	hasta 1.5	0.09	-

hasta 3.0	0.18	-
más de 3.0	0.27 o más	-

(1) Estas recomendaciones pueden requerir modificaciones debido a la conformación corporal de los animales. Se recomienda que la altura de la jaula permita al animal permanecer en una posición cómoda y que el área mínima del piso sea igual al cuadrado de la suma de la longitud del perro en metros (de la punta de la nariz a la base de la cola) más 0.15 m.

(2) La altura de la jaula debe ser suficiente para permitir al animal permanecer erecto con sus patas sobre el piso.

CUADRO 2.3

TEMPERATURAS DE BULBO SECO RECOMENDADAS

PARA LOS ANIMALES DE LABORATORIO COMUNES

ANIMAL	TEMPERATURA °C
Ratón, rata, hámster, cobayo	18-26
Conejo	18-22
Gato, perro	18-29
Animales de granja y aves de corral	16-27

VI.3. Ventilación.

Por muchos años se ha considerado que 10-15 cambios de aire fresco por hora es un estándar general aceptable. La mínima ventilación requerida se determina calculando el enfriamiento necesario para controlar el calor que se espera que genere la mayor cantidad de animales a albergar en el recinto en cuestión más cualquier calor que se espere que produzcan otras fuentes y por la transferencia de calor a través de las superficies de la habitación. El método de cálculo de la carga de enfriamiento total también puede usarse para un espacio animal que tiene una tasa de ventilación fija para determinar el número máximo de animales (basado en la masa animal total) que pueden albergarse en el espacio.

Las cajas con aislamiento filtrado sin ventilación forzada, como las que se usan en algunos tipos de albergues de roedores, imponen restricciones a la ventilación. Para compensar puede ser necesario ajustar las prácticas de crianza - incluyendo saneamiento, ubicación de cajas en el recinto secundario y densidad de cajas - para mejorar el microambiente y la disipación de calor. Es preferible el uso de aire no reciclado para la ventilación de los animales y de las áreas de apoyo.

VI.4. Iluminación.

La iluminación debe difundirse a través del área de animales y ser suficiente para el bienestar de los animales, las prácticas de mantenimiento, la adecuada inspección de los animales y proporcionar condiciones seguras de trabajo para el personal. La luz es necesaria para la adecuada visión y regulación neuroendocrina de los ciclos diurnos y circadianos.

La luz de 325 lux (30 candelas - pie) a 1.0 m sobre el piso parece suficiente para el cuidado animal y no causa signos clínicos de retinopatía fototóxica en ratas albinas y niveles de hasta 400 lux (37 candelas - pie) medido en un cuarto vacío a 1 m del piso es satisfactorio para roedores si se usan prácticas de manejo para prevenir daños retinales en albinos.

VI.5. Ruido.

El ruido producido por los animales y por las actividades de cuidado es inherente a las instalaciones para animales. Por lo tanto, en el diseño y operación de las instalaciones debe considerarse el control del ruido. Para apreciar los efectos potenciales del ruido debe considerarse la intensidad, frecuencia, rapidez del umbral, duración y potencial de vibración del sonido, así como el rango de audición, historia de exposición al ruido y susceptibilidad al efecto del ruido en las especies, grupo o cepa.

La separación de las áreas humanas y animales minimiza los disturbios tanto a humanos como a animales. Los animales ruidosos, como perros, cabras y primates, deben albergarse lejos de animales más silenciosos como roedores, conejos y gatos. Los ambientes deben diseñarse para acomodar animales que hacen ruido más que acudir a métodos para reducción del ruido.

La exposición a ruidos mayores de 85 dB puede producir efectos auditivos y no auditivos incluyendo eosinopenia e incremento del peso de adrenales en roedores, fertilidad reducida en roedores y aumento en la presión sanguínea en primates. Muchas especies pueden oír frecuencias de sonido que son inaudibles para el humano por lo que debe tomarse en cuenta el efecto potencial del equipo, como pantallas de vídeo y los materiales que producen ruido en el rango de audición de los animales cercanos. Hasta donde sea posible, las actividades que producen ruido deben realizarse en habitaciones o áreas separadas de aquellas donde se albergan los animales.

Debido a que los cambios en los patrones de la exposición al sonido tienen diferentes efectos en los animales, el personal debe tratar de minimizar la producción de ruido innecesario. El ruido excesivo e intermitente puede minimizarse entrenando personal en alternativas a las prácticas que producen ruido y usando amortiguadores en carretillos, estantes y similares. Los radios, alarmas y otros generadores de sonido no deben usarse en las habitaciones de animales a menos que sean parte de un protocolo aprobado o un programa de enriquecimiento.

VII. MANEJO DE LA CONDUCTA

VII.1. Ambiente estructural.

Dependiendo de las especies animales y de su uso el ambiente estructural debe incluir superficies de reposo, perchas, juguetes, implementos de forrajeo, materiales de anidamiento, túneles, objetos que aumenten las oportunidades para la expresión de posturas y actividades típicas de la especie y aumenten el bienestar del animal.

VII.2. Ambiente social.

Factores como la densidad poblacional, habilidad para dispersarse, familiaridad inicial entre animales y el rango social deben evaluarse cuando los animales se agrupan. Al elegir un ambiente social adecuado debe prestarse atención a si los animales son naturalmente territoriales o comunales y si deben albergarse individualmente, en parejas o en grupos. La comprensión de la conducta social natural típica de la especie facilita el albergue social exitoso.

Es deseable que los animales sociales se alberguen en grupos; sin embargo, cuando deben albergarse solos, deben proveerse otras formas de enriquecimiento para compensar la ausencia de otros animales, tales como una interacción segura y positiva con el personal y enriquecimiento del ambiente estructural.

VII.3. Actividad.

Los animales deben tener la oportunidad de exhibir los patrones de actividad típicos de la especie. Los perros, gatos y muchos animales domesticados se benefician de la interacción humana positiva. Los perros pueden recibir la oportunidad de actividad caminando con una correa, teniendo acceso a correr o moviéndose a otra área (como una habitación, jaula grande o corral exterior) para contacto social, juego o exploración. Las jaulas se usan frecuentemente para albergue a corto plazo de perros para atención veterinaria y para otros propósitos pero los corrales, patios y otras áreas externas a las jaulas proveen más espacio para el movimiento y se recomienda su uso.

VIII. CRIANZA

VIII.1. Alimento.

Los manejadores de colonias de animales deben ser juiciosos en la adquisición, transporte, almacenamiento y manejo del alimento para minimizar la introducción de enfermedades, parásitos, vectores potenciales de enfermedades (p. ej. insectos) y contaminantes químicos hacia las colonias de animales. Los compradores deben considerar los procedimientos y prácticas de los fabricantes y proveedores para proteger la dieta y asegurar la calidad. Las instituciones deben urgir a los vendedores de alimento para que provean datos periódicos de los análisis de nutrientes críticos. Los datos de manufactura y otros factores que afectan la vida útil del alimento deben ser conocidos por el usuario. El transporte o almacenamiento inapropiados del alimento pueden producir deficiencia de nutrientes en el alimento. Debe prestarse atención a las cantidades recibidas en cada entrega y las existencias deben rotarse de manera que el alimento más viejo se use primero.

Las áreas en las que se procesan o almacenan dietas o ingredientes de dietas deben mantenerse limpias y cerradas para evitar entrada de plagas. El alimento debe almacenarse aislado del piso en estantes, anaqueles o carretillos. Los sacos de alimento abiertos y sin usar deben almacenarse en contenedores a prueba de parásitos para minimizar la contaminación y evitar la dispersión potencial de agentes patógenos. La exposición a temperaturas por encima de 21°C, humedades relativas extremas, condiciones insalubres, luz, oxígeno, e insectos y otros parásitos aumenta el deterioro del alimento.

Las dietas autoclavables requieren ajustes en la concentración de nutrientes, tipos de ingredientes y métodos de preparación para compensar la degradación durante la esterilización. Debe registrarse la fecha de preparación y la dieta debe usarse prontamente. Deben considerarse las dietas irradiadas como una alternativa a las dietas autoclavadas.

Los comederos deben diseñarse y colocarse para permitir el fácil acceso al alimento y para minimizar la contaminación con orina y heces. Cuando los animales se albergan en grupos debe haber suficiente espacio y suficientes puntos de alimentación para minimizar la competencia por el alimento y asegurar el acceso a éste para todos los animales, especialmente si el alimento está restringido como parte del protocolo o rutina de manejo. Los contenedores de alimento no deben moverse entre áreas con diferentes riesgos de contaminación y deben lavarse y sanearse regularmente.

Se ha demostrado que la restricción moderada a la ingesta de calorías y proteína por razones clínicas o de crianza aumenta la longevidad y disminuye las tasas de obesidad, reproducción y cáncer en varias especies. Tal restricción puede lograrse disminuyendo la energía metabolizable, la densidad de proteína o ambas o controlando la cantidad de la ración o la frecuencia de alimentación.

VIII.2. Agua.

Ordinariamente, los animales deben tener acceso a agua potable de acuerdo a sus requerimientos particulares. La calidad del agua y la definición de potabilidad pueden variar localmente. Puede ser necesario el monitoreo periódico de pH, dureza y contaminantes microbiológicos o químicos para asegurar que la calidad del agua sea aceptable particularmente en estudios en los que los componentes normales del agua en una localidad dada puedan influenciar los resultados obtenidos.

VIII.3. Cama.

Ningún encamado es ideal para cualquier especie dada en todas las condiciones experimentales y de manejo y ninguna es ideal para todas las especies (p. ej. el material de cama que permite la

nidificación se recomienda para algunas especies). Los tratamientos con calor aplicados antes de que los materiales de cama se usen reducen la concentración de hidrocarburos aromáticos y puede evitar este problema. El material de cama debe transportarse y almacenarse aislado del piso en estantes, sacos o carretillos de un modo consistente con la calidad y minimización de la contaminación. Durante el autoclavado el encamado puede absorber humedad y como resultado pierde absorbancia y permite el crecimiento de microorganismos. Por eso, deben usarse tiempos apropiados de secado y condiciones de almacenamiento.

El encamado debe usarse en cantidades suficientes para mantener los animales secos entre cada cambio y, en el caso de pequeños animales de laboratorio, debe evitarse que la cama entre en contacto con los tubos de agua porque ello puede causar la inundación de la jaula.

VIII.4 Saneamiento.

El saneamiento - mantenimiento de condiciones que conducen a la salud - involucra los cambios de cama (según sea apropiado), limpieza y desinfección. La limpieza remueve las cantidades excesivas de desechos y la desinfección reduce o elimina concentraciones inaceptables de microorganismos.

VIII.4.a. Cambio de cama.

La frecuencia del cambio de cama es un tema de juicio profesional basado en la consulta con el investigador y depende de factores como el número y tamaño de los animales en el recinto primario, tamaño del recinto, cantidad de orina y heces producidas, aparición de humedad en la cama y las condiciones experimentales, como cirugía o debilitamiento, que puedan limitar el movimiento del animal o acceso a áreas de la jaula que no se han ensuciado con orina o heces.

VIII.4.b. Limpieza y desinfección de recintos primarios.

Para corrales y patios es apropiado el lavado frecuente con agua y el uso periódico de detergentes o desinfectantes para mantener las superficies suficientemente limpias. Si los desechos de los

animales deben removerse por lavado este se hará al menos una vez al día y los animales deben mantenerse secos durante esta operación. La hora para realizar esta actividad debe tomar en cuenta los procesos fisiológicos y de conducta normales de los animales.

La frecuencia de saneamiento de jaulas, estantes y equipo asociado, como comederos y bebederos, esta gobernada en parte por los tipos de jaulas y las prácticas de crías usadas, incluyendo el uso de camas de contacto o no contacto cambiadas regularmente, lavado regular de bandejas recolectores de desechos suspendidos y el uso de jaulas de piso de alambre o perforado. En general, los recintos y accesorios, como tapas, deben sanearse al menos cada dos semanas. Las jaulas de piso sólido, botellas y pipetas usualmente requieren saneamiento al menos una vez a la semana. Algunos tipos de jaulas y estantes requieren limpieza y desinfección menos frecuente, aquí se incluyen grandes jaulas con baja densidad de animales y cambios frecuentes de animales, jaulas que albergan animales en condiciones gnotobióticas con frecuentes cambios de cama, cajas ventiladas individualmente y jaulas usadas en circunstancias especiales.

Los conejos y algunos roedores, como cobayos y hámsters, producen orina con altas concentraciones de proteínas y minerales. Estos frecuentemente se adhieren a las superficies de la jaula y necesitan el tratamiento con soluciones ácidas antes del lavado.

Los recintos primarios pueden desinfectarse con agentes químicos, agua caliente, o una combinación de ambos. La duración y condiciones de lavado deben ser suficientes para matar las formas vegetativas de bacterias comunes y otros organismos controlables por un programa de saneamiento. Cuando solo se usa el agua caliente, lo que desinfecta es el efecto combinado de la temperatura y el tiempo de duración a esa temperatura (factor de calor acumulativo). El mismo factor de calor acumulativo puede lograrse exponiendo a los organismos a muy altas temperaturas por muy cortos períodos o exponiéndolos a menores temperaturas por más largos períodos. Una desinfección efectiva se puede lograr lavando y enjuagando con agua a 61.7 - 82.2 °C o más.

El lavado y desinfección de jaulas y equipo a mano con agua caliente y detergente o desinfectante puede ser efectivo pero requiere atención a los detalles. Es particularmente importante asegurarse que las superficies se enjuaguen de todo químico residual y que el personal tenga equipo apropiado para protegerse del agua caliente o los agentes químicos usados en este proceso.

Los bebederos, pipetas, tapas, comederos y otras piezas pequeñas de equipo deben lavarse con detergentes, agua caliente y, cuando sea apropiado, con agentes químicos para destruir microorganismos.

Los métodos convencionales de limpieza y desinfección son adecuados para la mayoría del equipo empleado en los animales. Sin embargo, si se presentan los microorganismos patogénicos o si se mantienen animales con flora microbiana altamente definida o con el sistema inmune comprometido, puede necesitarse esterilizar las jaulas y equipo asociado después de lavar y desinfectar. Los esterilizadores

deben calibrarse y monitorearse regularmente para asegurar su seguridad y efectividad.

VIII.4.c. Limpieza y desinfección de recintos secundarios.

Todos los componentes de las instalaciones para animales, incluyendo cuartos de animales y espacios de apoyo (como áreas de almacenamiento, instalaciones para el lavado de jaulas, corredores y cuartos para procedimientos) debe lavarse regularmente y desinfectarse apropiadamente según las circunstancias y a una frecuencia basada en el uso del área y la naturaleza de la contaminación probable.

Los utensilios de limpieza deben estar asignados a áreas específicas y no deben transportarse entre áreas que posean diferentes riesgos de contaminación.

VIII.4.d. Monitoreo de la efectividad del saneamiento.

Este monitoreo puede incluir inspección visual de los materiales, monitoreo de la temperatura del agua o monitoreo microbiológico. La intensidad de los olores de los animales, particularmente del amonio, no debe usarse como el único medio de monitoreo del programa de saneamiento. La decisión de alterar la frecuencia de cambios de cama o lavado de jaulas debe basarse en factores como concentración de amonio, aspecto de la jaula, condición de la jaula, número y tamaño de animales en la jaula.

VIII.5. Eliminación de desechos.

Hay varias opciones para disponer efectivamente de los desechos, p. ej. contratos con firmas comerciales autorizadas o incineración en el propio sitio siempre y cuando se cumpla con las regulaciones existentes.

Deben colocarse receptáculos de desechos apropiadamente rotulados en sitios estratégicos. Los contenedores de desechos deben ser a prueba de derrames y contar con agarraderas firmes. Es recomendable usar bolsas desechables dentro de los contenedores y lavar éstos regularmente. Debe existir una área para almacenar los desechos que se mantengan libre de insectos y otros vermes.

Los desechos peligrosos deben esterilizarse, empacarse o procesarse por otro medio antes de salir de las instalaciones. Los cadáveres de animales pueden incinerarse en el sitio o recolectarse por alguien autorizado. Los procedimientos para empacar, etiquetar, transportar y almacenar estos desechos deben estar integrados en las políticas de seguridad y salud ocupacional.

VIII.6 Control de plagas.

Debe existir un programa para evitar, controlar o eliminar la presencia de plagas. Los pesticidas pueden inducir efectos tóxicos en los animales de investigación e interferir con los procedimientos experimentales y deben usarse en las áreas para animales solo cuando sea necesario. Siempre que sea posible, deben usarse métodos no tóxicos de control de plagas, como reguladores de crecimiento de insectos y sustancias no tóxicas (p. ej.; sílica gel amorfa). Si se usan trampas, los métodos deben ser humanos, las trampas que capturan los animales vivos deben revisarse frecuentemente y debe aplicarse eutanasia humanitaria después de la captura.

VIII.7 Cuido durante feriados, fines de semana y emergencias.

Los animales deben estar cuidados por personal calificado todos los días, incluyendo fines de semana y feriados, tanto para salvaguardar su bienestar como para satisfacer los requerimientos de la investigación. En el caso de una emergencia el personal de seguridad de la institución debe estar en posibilidad de localizar a las personas responsables de los animales.

IX. MANEJO DE LA POBLACIÓN

IX.1. Identificaciones y registros.

Los medios para la identificación de los animales incluyen: tarjetas en cuartos, estantes, corrales y jaulas con información escrita o en código de barras, collares, bandas, placas y etiquetas, tintes coloreados, orificios y muescas en las orejas, tatuajes y marcas congeladas. La amputación de dedos como método de identificación de roedores pequeños debe efectuarse solo en neonatos altriciales. Las tarjetas de identificación deben incluir la fuente del animal, la cepa, los nombres y localizaciones de los investigadores responsables, datos pertinentes y número de protocolo cuando sea aplicable.

IX.2. Genética.

Las características genéticas son importantes respecto a la producción y manejo de los animales a usar en colonias de reproducción e investigación biomédica. La información del pedigrí permite la selección apropiada de los pares de crianza y de los animales experimentales que no están relacionados entre sí o sin relación conocida.

Los animales exocriados se usan ampliamente en investigación. Los pies de cría deben ser suficientemente grandes para asegurar la heterogeneidad a largo plazo de la colonia. Para facilitar la comparación directa de los datos de investigaciones derivadas de animales exocriados, deben usarse técnicas de manejo genético para mantener la variabilidad genética. La variabilidad genética puede monitorearse con simuladores por computadora, marcadores bioquímicos, marcadores de ADN, marcadores inmunológicos o análisis genético cuantitativo de variables fisiológicas.

Se han desarrollado cepas endocriadas de varias especies, especialmente roedores, para cubrir necesidades de investigación específicas. La homocigosis de estos animales aumenta la reproducibilidad y comparabilidad de algunos datos experimentales. Es importante monitorear periódicamente los animales endocriados para determinar la homocigosis genética. Se han desarrollado varios métodos de monitoreo que usan técnicas inmunológicas, bioquímicas y

moleculares. Deben desarrollarse sistemas de manejo apropiados para minimizar la contaminación genética que resulta de las mutaciones.

IX.3. Cuidado médico veterinario.

Algunos aspectos del programa para cuidado veterinario pueden ser conducidos por otras personas que no sean el veterinario pero debe establecerse un mecanismo de comunicación frecuente y directa para asegurar que el veterinario recibirá información oportuna y precisa acerca de la salud, conducta y bienestar animal.

IX.4. Obtención y transporte de los animales.

Todos los animales deben adquirirse legalmente y la institución receptora debe hacer esfuerzos razonables para asegurar que todas las transacciones relacionadas con la obtención de los animales se hace de un modo legal. Todo vendedor potencial debe evaluarse respecto a la calidad de los animales que suministran. Todo transporte de animales, incluyendo el transporte intrainstitucional debe planearse para minimizar el tiempo de tránsito y el riesgo de zoonosis, proteger contra los extremos ambientales, evitar el hacinamiento, proveer comida y agua si es indicado y proteger contra traumas físicos. Es inevitable cierto estrés relacionado con el transporte pero se puede reducir atendiendo estos factores.

IX.5. Medicina preventiva.

Los programas de medicina preventiva son la combinación de políticas, procedimientos y prácticas relacionadas con cuarentena y separación de los animales por especie, origen y estatus de salud.

IX.6. Cuarentena, estabilización y separación.

La cuarentena es la separación de los animales recién recibidos de los que ya existen en el bioterio hasta que se determine el estatus de salud y microbiológico de los nuevos animales; esta práctica minimiza la probabilidad de introducción de patógenos en la colonia. La información que

suministran los proveedores de animales debe ser suficiente para determinar la duración de la cuarentena, los riesgos potenciales para el personal y los animales dentro de la colonia y la terapia necesaria antes de liberar los animales de la cuarentena. Los roedores no requieren cuarentena si los datos del proveedor son lo suficientemente actualizados y completos para definir el estatus de salud de los animales y se considera el riesgo de exposición a patógenos durante el transporte.

Independientemente del período de cuarentena, los animales deben tener un período de estabilización nutricional, fisiológica y psicológica antes de ser usados.

Se recomienda la separación por especies para evitar transmisión de enfermedades y eliminar la ansiedad y posibles cambios fisiológicos y conductuales debidos a conflictos interespecíficos. Esta separación se logra empleando cuartos separados, aunque también se pueden usar cubículos, unidades de flujo laminar y jaulas con filtros de aire. En algunos casos puede ser aceptable albergar diferentes especies en la misma habitación, por ejemplo si tienen un estatus de patógenos similar y son conductualmente compatibles.

IX.7. Inspección, diagnosis, tratamiento y control de enfermedades.

Como regla general los animales deben observarse diariamente para determinar signos de enfermedad, lesiones o conducta anormal; la frecuencia de las observaciones debe aumentar después de procedimientos operatorios, cuando los animales estén enfermos o tengan déficit físico.

Toda aparición de signos de enfermedad, estrés u otras modificaciones de la condición normal de los animales debe reportarse prontamente para procurar el tratamiento adecuado. Los animales con signos de enfermedades contagiosas deben aislarse de los sanos durante el proceso de diagnóstico, tratamiento y control.

Los medicamentos o terapias para el tratamiento deben elegirse por consulta entre el veterinario y el investigador.

X. CIRUGÍA

Debe existir un planeamiento prequirúrgico de parte del cirujano, anestesista, veterinario, técnicos, personal del bioterio e investigador. El plan quirúrgico debe identificar al personal, sus funciones y necesidades de entrenamiento y el equipo y suministros requeridos para los procedimientos planeados, la localización y naturaleza de las instalaciones en las que se realizarán los procedimientos y el plan de atención pre y postoperatorio. En algunos casos puede ser recomendable el uso preoperatorio de antibióticos pero esto no debe considerarse reemplazo de procedimientos asépticos.

Es importante que el personal esté entrenado en las buenas prácticas quirúrgicas: asepsis, manejo cuidadoso de los tejidos, disección mínima de los tejidos, uso de los instrumentos, hemostasis efectiva, uso correcto de materiales y patrones de sutura, características específicas de anatomía y fisiología, efecto de analgésicos y anestésicos y cuidados postoperatorios.

Los procedimientos quirúrgicos en general son mayores o menores y de sobrevivencia o de no sobrevivencia. La cirugía mayor de sobrevivencia penetra y expone una cavidad corporal o produce un desajuste sustancial de las funciones fisiológicas o físicas (tal como laparatomía, toracotomía, craniotomía, reemplazo de articulaciones y amputación de miembros). La cirugía menor no expone una cavidad corporal y causa poco o ningún desajuste físico (tal como sutura de heridas; canulación de vasos periféricos). Los procedimientos menores se realizan bajo condiciones menos exigentes pero aun requieren técnicas asépticas, instrumentos y anestesia apropiados.

En la cirugía de no sobrevivencia el animal recibe eutanasia antes de la recuperación de la anestesia. Las condiciones mínimas de estas cirugías son: engrapar el sitio de la cirugía, el uso de guantes y la limpieza de instrumentos y áreas adyacentes.

Cuando se empleen técnicas asépticas éstas deben incluir: preparación del animal (como remoción del pelo y desinfección del sitio operatorio), preparación del cirujano, (como provisión de vestimenta quirúrgica descontaminada, fregado quirúrgico y guantes quirúrgicos estériles), esterilización de instrumentos, suministro y materiales de implante y el uso de técnicas operativas para reducir la probabilidad de infección.

El monitoreo quirúrgico cuidadoso y la atención oportuna aumenta la probabilidad de un progreso quirúrgico exitoso. El monitoreo incluye la revisión de la profundidad de la anestesia, la función fisiológica y de los signos y condiciones clínicas. El mantenimiento de temperatura corporal normal minimiza los disturbios cardiovasculares y respiratorios causados por los anestésicos y es de particular importancia.

El planteamiento prequirúrgico debe especificar los requerimientos de monitoreo, cuidado y mantenimiento de registros postquirúrgicos incluyendo el personal que realizará tales labores. Un componente importante en este aspecto es la observación del animal y la intervención durante la recuperación de anestesia y cirugía. La intensidad del monitoreo variará con las especies y el procedimiento y será mayor durante el período inmediato de recuperación de la anestesia. Durante este período el animal debe mantenerse en una área limpia y seca donde pueda ser observado frecuentemente por personal entrenado. Debe prestarse especial atención a las funciones termorreguladoras, vascular y respiratoria así como al dolor postoperativo y a las molestias durante la recuperación de fluidos parenterales para el mantenimiento del balance de agua y electrolitos, analgésicos y otras drogas; cuidado de incisiones quirúrgicas y mantenimiento de registros médicos apropiados.

Después de la recuperación de la anestesia el monitoreo frecuente es menos intenso pero debe incluir atención a las funciones biológicas básicas y a los signos conductuales de dolor, monitoreo de infecciones, monitoreo de la incisión quirúrgica, vendando si es apropiado y removiendo oportunamente las suturas, clips o grapas de la piel.

XI. DOLOR, ANALGESIA Y ANESTESIA

El uso apropiado de anestésicos y analgésicos en animales de investigación es un imperativo ético y científico. Algunas manifestaciones conductuales se usan como indicativas de dolor, por ejemplo, vocalización, depresión u otros cambios de la conducta, apariencia o postura anormal e inmovilidad. Es esencial que el personal esté familiarizado con tales indicaciones. En general, se asume que los procedimientos que causarían dolor en los humanos también lo causarían en los animales.

La selección de un anestésico o analgésico depende de factores como especie y edad del animal, el tipo y grado de dolor, la probabilidad de efectos de un agente particular sobre órganos específicos, la longitud del procedimiento operativo y la seguridad de un agente para el animal

particularmente si se induce un déficit fisiológico mediante un procedimiento experimental o quirúrgico. Algunas veces se usan agentes bloqueadores neuromusculares (como el pancuronio) para paralizar los músculos esqueléticos durante la cirugía en la que se han administrado anestésicos generales. En estos casos, muchos signos que reflejan la profundidad de la anestesia son eliminados por la parálisis. Sin embargo, cambios en el sistema nervioso autónomo (como cambios repentinos en ritmo cardíaco o presión sanguínea) pueden ser indicadores de dolor asociado a una inadecuada profundidad de la anestesia. Si se usan agentes paralizantes se recomienda definir previamente la cantidad adecuada de anestésico a usar. El uso de agentes paralizantes debe ser evaluado por el CICUA para asegurar el bienestar del animal.

XII. EUTANASIA

La eutanasia es el acto de matar animales empleando métodos que induzcan una rápida inconsciencia y muerte sin dolor ni sufrimiento. Para evaluar el método apropiado debe considerarse la habilidad de inducir inconsciencia, limitaciones de especie y edad, compatibilidad con los objetivos de la investigación y la seguridad y efecto emocional en el personal.

La eutanasia puede ser necesaria al final de un protocolo o como un medio para aliviar dolor o estrés que no se pueda aliviar por analgésicos, sedantes u otros tratamientos. Debe realizarse sin que haya otros animales presentes empleando un método acorde con la especie y los objetivos del protocolo. Generalmente, son preferibles los agentes inhalantes o no inhalantes (barbitúricos, CO₂) antes que los métodos físicos (dislocación cervical, decapitación). Todos los métodos deben ser revisados y aprobados por el CICUA. La eutanasia debe ser realizada por personal adecuadamente preparado que además sea capaz de reconocer el cese de los signos vitales.

XIII. PLANTA FÍSICA

El diseño y tamaño de una instalación para animales de laboratorio o bioterio depende de las actividades de investigación de la institución, los animales a albergar, la relación física con el resto de la institución y la localización geográfica.

Para un buen manejo de los animales, comodidad del personal y protección de la salud se requiere que las instalaciones para animales estén separadas del área para el personal, como oficinas y

cuartos de conferencias. Los animales deben albergarse en áreas dedicadas para ese propósito y no en laboratorios meramente por conveniencia.

Los materiales de construcción elegidos deben permitir la operación higiénica y eficiente del bioterio. Para las superficies internas son deseables los materiales durables, a prueba de humedad y fuego y sin suturas. Las pinturas no deben ser tóxicas.

XIII.1 Áreas funcionales.

Se requiere espacio para:

- Albergue, cuidado y saneamiento de los animales.
- Recepción, cuarentena y separación de los animales.
- Separación de especies o aislamiento de proyectos individuales cuando sea necesario.
- Almacenamiento.

La mayoría de las instalaciones multipropósito también incluyen lo siguiente:

- Laboratorios especializados o espacios contiguos a las áreas de animales para cirugía, cuidado intensivo, necropsia, radiografía, preparación de dietas especiales, procedimientos experimentales, tratamiento clínico y procedimientos diagnósticos de laboratorio.
- Instalaciones o equipo para contaminantes si se van a usar agentes físicos, químicos o biológicos peligrosos.

- Áreas para recepción y almacenamiento de alimentos, camas, farmacéuticos, biológicos y suministros.

- Espacio para lavado y esterilización de equipos y suministros y dependiendo del volumen del trabajo, máquinas para el lavado de jaulas, botellas, cristalería, estantes y desechos, una pila, una autoclave para equipo, alimento y camas y áreas separadas para contener equipo sucio y limpio.

- Espacio para almacenar desechos antes de incinerarlos o removerlos.

- Espacio para almacenamiento frío de cadáveres.

- Espacio para el personal administrativo y supervisor incluyendo espacio para entrenamiento y educación.

- Duchas, fregaderos, roperos, servicios sanitarios y áreas de descanso para el personal.

XIII.2 Lineamientos de construcción.

XIII.2.a. Corredores.

Los corredores de 2 a 2.75 m de ancho son adecuados para la mayoría de las instalaciones. Las uniones entre el piso y la pared deben ser tales que faciliten la limpieza. Siempre que sea posible, las líneas de agua, electricidad, drenaje y otras deben ser accesibles por medio de paneles en los corredores fuera de los cuartos de animales.

XIII.2.b. Puertas de los cuartos de animales.

Por seguridad las puertas deben abrirse hacia los cuartos de animales pero si es necesario que se abran hacia un corredor deben existir vestíbulos. Las puertas deben tener aproximadamente 1.10 x 2.2. m para permitir el paso de estantes y equipo, deben ajustarse firmemente en su marcos y deben estar construidas con materiales que resistan la corrosión.

XIII.2.c. Ventanas exteriores.

Para animales como primates, perros y algunos animales de granja, las ventanas son un elemento de enriquecimiento ambiental pero son inadecuadas si la temperatura no se puede regular apropiadamente por el intercambio de calor a través de la ventana o si el fotoperíodo es un factor importante.

XIII.2.d. Pisos.

Los pisos deben ser resistentes a la humedad y a los golpes, no absorbentes y relativamente llanos. Deben resistir la acción de la orina y otros materiales biológicos así como los efectos del agua caliente y los agentes de limpieza; también deben resistir el peso de los estantes, equipo y artículos almacenados sin hundirse, quebrarse o levantarse. Dependiendo de su uso deben ser monolíticos o tener el menor número posible de uniones.

XIII.2.e. Drenaje.

Cuando se construyen pisos drenados estos deben contar con una pendiente y las trampas del drenaje deben mantenerse llenas de líquido. Las tuberías del drenaje deben tener al menos 10 cm de diámetro aunque en instalaciones para perros y animales de granja deben ser mayores. Cuando los drenajes no se usan por mucho tiempo deben sellarse para evitar el refluo de gases o sustancias contaminantes. Los pisos drenados no son necesarios en todos los cuartos para animales, en particular para los roedores. Estos pueden limpiarse adecuadamente con estropajos y desinfectantes.

XIII.2.f. Paredes.

Las paredes deben ser lisas, resistentes a la humedad, no absorbentes y resistentes a los golpes. No deben tener grietas, penetraciones sin rellenar, o uniones imperfectas con puertas, techos, pisos y esquinas. Los materiales de las superficies deben soportar el lavado con detergentes y desinfectantes así como el impacto del agua a alta presión.

XIII.2.g. Techos.

Los techos deben ser lisos, resistentes a la humedad y libres de uniones imperfectas. Los techos de concreto repellados y pintados son adecuados no así los techos suspendidos. Las tuberías, duchas e instalaciones eléctricas expuestas no son deseables a menos que se puedan limpiar adecuadamente.

XIII.2.h. Ventilación y aire acondicionado.

El control de temperatura y humedad reduce las variaciones debidas a los cambios en condiciones climáticas o a diferencias en el número y tipo de animales en una habitación. La humedad relativa debe mantenerse en el rango de 30 a 70% y la temperatura se regula mejor con un control termostático en cada habitación (ver cap. II).

En algunos casos se recomiendan los filtros de aire de alta eficiencia para las instalaciones de animales, o instalaciones quirúrgicas y de otros procedimientos. También debe tomarse en cuenta la regulación por diferencias de presión de aire en áreas quirúrgicas, de procedimientos, de albergue y de servicio. Por ejemplo, áreas para cuarentena, albergue y uso de animales expuestas a materiales peligrosos deben mantenerse bajo una presión relativa negativa, mientras que áreas para cirugía, almacenamiento de equipo limpio y albergue de animales libres de patógenos debe mantenerse bajo una presión relativa positiva con aire limpio.

XIII.2.i. Energía e iluminación.

El sistema eléctrico debe ser seguro y proveer iluminación apropiada, número suficiente de toma corrientes y amperaje adecuado para el equipo especializado. En caso de fallo eléctrico debe existir un suministro de energía de emergencia para mantener servicios críticos (como VAA) o funciones de apoyo (como ventiladores, congeladores y aisladores).

Debe usarse un sistema de iluminación controlado por reloj automático para asegurar un ciclo de iluminación uniforme. En áreas con alto uso de agua, como las de lavado, deben usarse interruptores y toma corrientes resistentes a la humedad.

XIII.2.j. Áreas de almacenamiento.

Deben existir espacios adecuados para almacenamiento de equipo, suministros, alimento, cama y desechos. Los corredores no son sitios adecuados para este fin. Los materiales de cama y los alimentos deben almacenarse en una área separada en la que no existan sustancias tóxicas o peligrosas. Las áreas para materiales de desecho deben estar separadas de las demás (ver cap. II). Para almacenar animales muertos es esencial un refrigerador a 7°C separado de otros artículos almacenados en frío.

XIII.2.k. Control del ruido.

Las paredes de mampostería son más efectivas que las de metal o plástico para contener los ruidos. En algunas situaciones son apropiados los materiales sonoatenuantes lavables adosados a las paredes o techos. Las puertas dobles o sonoatenuados ayudan a controlar la transmisión del sonido desde los corredores.

XIII.2.l. Instalaciones para materiales de limpieza.

Debe existir un área central para la limpieza de cajas y equipo tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- Localización respecto a los cuartos de animales y áreas de almacenamiento de desechos.
- Facilidad de acceso, incluyendo puertas suficientemente anchas.
- Suficiente espacio para la permanencia y maniobra del equipo.
- Facilidad para disponer del material de cama y realizar actividades de pre lavado.
- Flujo de tráfico que permita separar animales y equipo entre áreas limpias y sucias.
- Aislamiento de paredes y techos cuando sea necesario.
- Atenuación de sonido.
- Agua fría y caliente, vapor, drenaje de pisos y energía eléctrica.
- Ventilación.

NOTA FINAL

Esta guía para el manejo de animales de laboratorio fue adaptada a partir de los siguientes documentos por Jorge Granados Zúñiga, ACCMAL, Costa Rica:

1. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Vol 1. Ottawa. 1980. 106 p.p.

2. National Research Council: Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington. 1996. 125 p.p.

Comité Revisor:

Liliana Pazos Sanou, ACCMAL, Costa Rica.

Gerardo Huertas, WSPA, Costa Rica.

Patricia Arguedas, WSPA, Costa Rica.

Rubén Arjona, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Costa Rica.