



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE INDICADORES CONDUCTUALES DE DOLOR
ASOCIADOS A LA INYECCIÓN ENDOVENOSA DE ENDO T EN
RATONES (*Mus musculus*).**

María Catalina Fuentes Espinosa

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: TAMARA A. TADICH GALLO
Departamento de Fomento de la Producción Animal

**“ENDO T UNA NUEVA FORMULACIÓN MOVILIZADORA DE CÉLULAS MADRES
HEMATOPOOYÉTICAS: ENSAYO PRE-CLÍNICO EN MODELO MURINO-SEGUNDA
ETAPA”**

SANTIAGO, CHILE
2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE INDICADORES CONDUCTUALES DE DOLOR
ASOCIADOS A LA INYECCIÓN ENDOVENOSA DE ENDO T EN
RATONES (*Mus musculus*).**

María Catalina Fuentes Espinosa

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

Nota Final

Firma

Profesor Guía: Dra. Tamara Alejandra Tadich Gallo

Profesor Corrector: Dr. Carlos Alvear

Profesor Corrector: Dr. Rigoberto Antonio Solis Muñoz

SANTIAGO, CHILE

2019

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría partir agradeciendo a mi familia, a mi madre y hermanos por comprenderme en aquellos días en donde, por las agotadoras horas de estudio no contestaba de la mejor manera, por siempre apoyarme y creer en mi cuando muchas veces, yo misma no lo hacía. A mi padre, que partió antes de tiempo sin darme la oportunidad de tener y disfrutar de su compañía y contención durante la última parte de este largo camino, pero sé que siempre estuvo presente acompañándome de alguna manera. Sin ellos no habría tenido la fortaleza y las herramientas necesarias para haber llegado hasta acá.

A mi pololo, quién comparte la misma vocación por la profesión y siempre tuvo una palabra de aliento y apoyo hacia mí en los momentos que más lo necesité, y a mis amigas, que siempre confiaron en que yo podía lograrlo.

Por otro lado, no puedo dejar de agradecer a la Dra. Tadich, mi profesora guía, que me aceptó como tesista y siempre tuvo la buena disposición de ayudarme en todas las etapas de la elaboración de la tesis, corrigiendo y resolviendo mis dudas respecto a los temas que iban surgiendo. A las personas con las que compartí en este proceso, por su buen recibimiento y buena energía. También agradezco a Normita, la secretaria del Departamento de Fomento de la Producción Animal por su buen trato y amabilidad.

Por último, también agradecer a todas aquellas personas con las que compartí durante este largo camino, compañeros, funcionarios y profesores que, de alguna u otra manera fueron parte de mi formación profesional en FAVET, la cual siempre atesoraré.

ABSTRACT

Preclinical trials are necessary to, among other things, ensure that new formulations of drugs have no adverse effects on individuals, one of which may be the generation of pain at the time of application. Therefore, this project assessed if the intravenous inoculation of the drug ENDO T generates behavioral changes associated with pain in *Mus musculus* mice. The study was conducted in two replicates and consisted of three experimental groups. Group one received ENDO T, the second group received a placebo and the third one the conventional treatment (GM-CSF-PEG). The duration and frequency of maintenance behaviors for each group were obtained through continuous video recordings at three different times: 24 hours before the inoculation of the treatments (pre), immediately after inoculation (post-1) and 24 hours after inoculation (post-2). A total of 270 hours of videos were analyzed by focal sampling with the Observer XT software. The mice facial expressions were assessed through the "*Mouse Grimace Scale (MGS)*". The data was analyzed with Analysis of Variance or Kruskal-Wallis statistical tests. The injection procedure generated pain, regardless of the treatment received. More pain associated behaviors were manifested in the conventional treatment group than in the other groups in post-1, but the *MGS* didn't show significant changes. The ENDO T group showed behavioral changes in post-2 which together with the *MGS* could indicate that the drug generates pain in a period greater than 24hrs. However, it would be necessary to conduct further studies to determine if the drug doesn't cause pain after 24hrs.

Keywords: maintenance behavior, pain, facial expression, mouse, ENDO T.

RESUMEN

Los ensayos preclínicos son necesarios para, entre otras cosas, garantizar que nuevas formulaciones de medicamentos no tengan efectos adversos en los individuos, uno de los cuales puede ser la generación de dolor al aplicarlo. Por lo tanto, este proyecto evaluó si la inoculación intravenosa de la droga ENDO T genera cambios conductuales asociados a dolor en ratones *Mus musculus*. El estudio se realizó en dos réplicas y consistió en tres grupos experimentales. El primer grupo recibió ENDO T, el segundo recibió un placebo y el tercero el tratamiento convencional (GM-CSF-PEG). La duración y frecuencia de las conductas de mantención para cada grupo se obtuvieron por videograbaciones continuas en tres momentos diferentes: 24 horas antes de la inoculación de los tratamientos (pre), inmediatamente después de la inoculación (post-1) y 24 horas después (post-2). Se analizó un total de 270 horas de videos por muestreo focal con el software Observer XT. Las expresiones faciales de los ratones se evaluaron a través de la "*Mouse Grimace Scale (MGS)*". Los datos fueron analizados con pruebas estadísticas: Análisis de Varianza o Kruskal-Wallis. El procedimiento de inyección generó dolor, independientemente del tratamiento recibido. El grupo del tratamiento convencional manifestó más cambios conductuales asociados a dolor en el post-1, pero la *MGS* no mostró cambios significativos. El grupo ENDO T mostró cambios conductuales en el post-2 que, junto con la *MGS*, podrían indicar que la droga genera dolor retardado. Sin embargo, sería necesario realizar estudios adicionales para determinar si el medicamento no causa dolor después de 24hrs.

Palabras claves: conducta de mantención, dolor, expresión facial, ratón, ENDO T.

INTRODUCCIÓN

Desde hace tiempo ha existido conciencia y preocupación por los animales que están bajo el cuidado humano, en particular por su bienestar. Debido a esto, se han desarrollado principios sobre el bienestar de los animales de laboratorio, acuáticos y terrestres (OIE, 2015). El bienestar animal hace referencia a cómo el animal está haciendo frente a las condiciones en las que vive, es decir, si el animal está adaptándose al medio expresando su comportamiento innato, libre de enfermedad, sin pasar hambre y seguro (OIE, 2011). Como el uso de animales en experimentación puede causar un detrimento en su bienestar, en 1959 en el libro *The Principles of Humane Experimental Technique* se publicaron los principios de “Las 3 Rs”; reemplazo, reducción y refinamiento (Russel y Burch, 1959), estos se originaron como una forma de minimizar o eliminar los tratos no-humanitarios en las actividades con animales en investigación (Tannenbaum y Bennett, 2015). Una de las actividades en las que se utilizan animales de laboratorio son los ensayos preclínicos realizados a los fármacos antes de que salgan al mercado, siendo su objetivo asegurar, por ejemplo, que las formulaciones no tengan efectos adversos (Marovac, 2001), como la generación de dolor.

El dolor, causal de sufrimiento, es definido como una experiencia sensorial o emocional desagradable, asociada a daño tisular real o potencial (López *et al.*, s.f). Para determinar si un animal está experimentando dolor hay que recurrir a signos externos (Aigé y Cruz, 2001) como cambios conductuales, posturales o de expresión facial (Weary *et al.*, 2006). Existen instrumentos, como la “*Mouse Grimace Scale*” (MGS) que se aplica a los ratones de laboratorio, que evalúa gestos faciales para determinar si el individuo está experimentando dolor (Langorf *et al.*, 2010). Este instrumento ha sido aplicado en ratones sometidos a vasectomía y evaluaciones de eficacia de analgésicos post operatorio en ratones (Leach *et al.*, 2012; Matsumiya *et al.*, 2012). Por esto en el presente estudio se evaluó si la aplicación endovenosa del medicamento ENDO T genera cambios conductuales indicadores de dolor. Este producto es una formulación diseñada para incrementar y dirigir la movilización de células madre permitiendo la regeneración cardiovascular y de tejidos. Ya que, en estudios preliminares de esta droga hubo distintas reacciones asociadas a dolor en ratones, el objetivo de este estudio fue determinar si la nueva formulación ENDO-T inoculada por vía endovenosa genera cambios conductuales asociados a dolor en ratones *Mus musculus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Individuos: Para el proyecto se utilizó un total de 60 ratones *Mus musculus* de la cepa BALB/c. El total de ratones utilizados eran machos adultos de 20 semanas de edad y 25 gramos de peso. Estos se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Salud Pública (ISP).

Alojamiento: El lugar utilizado para el ensayo fueron cubículos de 44 cm x 22 cm x 18 cm de alto, teniendo un espacio de 96,8 cm²/animal. Estos tenían dos paredes transparentes, en donde se colocaron las cámaras, y las dos paredes restantes se cubrieron con papel negro para incentivar al animal a mirar hacia donde estaban las cámaras. Cada cubículo contaba con viruta, dos conos de cartón para enriquecimiento ambiental, alimentación y agua *ad libitum* para los individuos.

Cámaras de video: La obtención de los registros fue a través de 4 cámaras GoPro Hero 5 Session y 2 cámaras GoPro Hero 4. Se colocaron dos cámaras por cubículos, frente a las paredes transparentes de cada uno, maximizando así las tomas de la cabeza. Se utilizó una resolución de 1080 Mpx.

Tratamientos: Se utilizó suero fisiológico como placebo, el tratamiento convencional (GM-CSF-PEG) como control positivo y la formulación en estudio (ENDO T). Todos los tratamientos se administraron por vía endovenosa (vena caudal) con aguja 27-23G en un volumen no mayor a 80 microlitros como dosis única.

El proyecto cuenta con la aprobación del CICUA de la Universidad de Chile, certificado número 18176-VET-UCH (Anexo 1).

Métodos.

El estudio se realizó en dos fases debido a la capacidad de espacio de la unidad de mantención de animales. Primero se realizó el ensayo con 30 individuos dispuestos en 3 jaulas con 10 ratones cada uno (Grupo A), a la semana siguiente se repitió el ensayo con 30 ratones más (Grupo B). Contando al final de las dos fases con 20 individuos por grupo de tratamiento. El tamaño de muestras se basó en diversos estudios donde evaluaron indicadores de dolor en

grupos de 6 a 20 animales (Leach *et al.*, 2012; Matsumiya *et al.*, 2012; DallaCosta *et al.*, 2014).

Habitación: El primer día del estudio los individuos tuvieron un periodo de 24 horas para adaptarse al recinto y a sus compañeros de cubículo.

Videograbaciones: Los siguientes tres días, posteriores al periodo de habitación, se realizaron dos videograbaciones por cubículo, de 90 minutos cada una, para obtener el registro conductual de los individuos desde dos ángulos. El registro conductual se realizó de forma continua y focal para, obtener así un presupuesto de tiempo para cada individuo, es decir, el porcentaje de tiempo de dedicación a cada conducta y las duraciones totales y frecuencias de cada una de éstas para cada individuo. Las conductas analizadas se encuentran descritas en el etograma presentado en la Tabla 1.

Tabla 1: Etograma de las conductas a evaluar.

CONDUCTAS	DEFINICIÓN
Acicalar (s)	El animal se lava o se rasca la cara y el cuerpo.
Beber (o)	El animal toma agua desde el bebedero.
Comer (o)	El animal come desde el comedero o del suelo.
Dormir (s)	El animal permanece en estación con los ojos cerrados.
Explorar (o)	El animal olfatea el lugar sentado o parado en dos patas.
Escarbar (o)	El animal mantiene su hocico bajo la viruta y escarba en ella con las patas.
Escalar (s)	El animal se sube al techo de la jaula.
Sociabilizar (o)	Los individuos se olfatean entre si.
En estación (s)	El animal se mantiene quieto en un lugar, sin moverse u olfatear.
Trasladarse (o)	El animal se mueve de un lugar a otro dentro de la jaula.
Lavarse o morderse la cola (o)	El individuo se toma la cola y se la lava, olfatea o la muerde.

(o)= número de ocurrencia; (s)= segundos

Fuente: Creación propia.

Las videograbaciones y registros conductuales se realizaron en tres tiempos durante el ensayo, estos fueron:

Evaluación previa al tratamiento (pre): En el segundo día del estudio los animales fueron grabados por 90 minutos para obtener un registro conductual previo a la aplicación de los

tratamientos. Esto permitió obtener información basal de las conductas de los individuos y que cada cubículo fuese su propio control.

Evaluación posterior al tratamiento (post-1): En el tercer día se realizaron las grabaciones (90 minutos) de las reacciones inmediatas de los animales a la administración de los tratamientos. Cada jaula corresponde a un tratamiento, es decir, los individuos de una misma jaula fueron inyectados con el tratamiento ENDO T (grupo droga en estudio), con el tratamiento convencional (GM-CSF-PEG) (control positivo) o con suero fisiológico (grupo placebo). Para el proceso de inoculación se removieron a los individuos del cubículo y se colocaron en otro contenedor, de ahí fueron sacados uno a uno, puestos en un contenedor de plástico individual, se les sumergió la cola en agua tibia (máximo 40°C) para dilatar y así visibilizar la vena de la cola, luego se les administró el tratamiento correspondiente. Inmediatamente posterior a esto se devolvieron a la jaula donde se iniciaron las grabaciones de los individuos. Los tratamientos fueron ciegos para el observador, para esto cada jaula se rotuló con un código que sólo conocía el investigador responsable del proyecto.

Evaluación 24 horas después (post-2): El cuarto día se realizaron grabaciones (90 min) del comportamiento de los animales 24 horas después de haber sido inoculados con los tratamientos. Se evaluaron las mismas conductas descritas en la Tabla 1. Ese mismo día, en la tarde, se realizó la eutanasia de los animales (Anexo 2).

Expresiones faciales: se cuantificaron según la “*Mouse Grimace Scale*” (Figura 1). Para aplicar esta escala se obtuvieron 5 imágenes de cada video registrado. Desde el minuto 0 al minuto 20 se fueron pausando los videos cada 5 minutos para obtener cada imagen. En cada imagen se puntuó la posición de las orejas, bigotes, nariz y la tensión de la mejilla y de la órbita ocular de cada individuo, obteniendo así valores individuales para cada muestreo. Cabe destacar que el puntaje a obtener por cada animal varía entre 0 (sin dolor presente) y 10 (máximo dolor posible).

Registro conductual: se analizó a través del software Observer XT® (2011) en el cual se ingresó el etograma con las conductas de mantención a evaluar y se analizaron según estados (medidos en segundos) o eventos (medidos según el número de ocurrencia) dependiendo de cada caso, como se señala en la Tabla 1. Cada animal fue analizado individualmente por lo que fueron 270 horas totales de observaciones que se realizaron en dos meses.

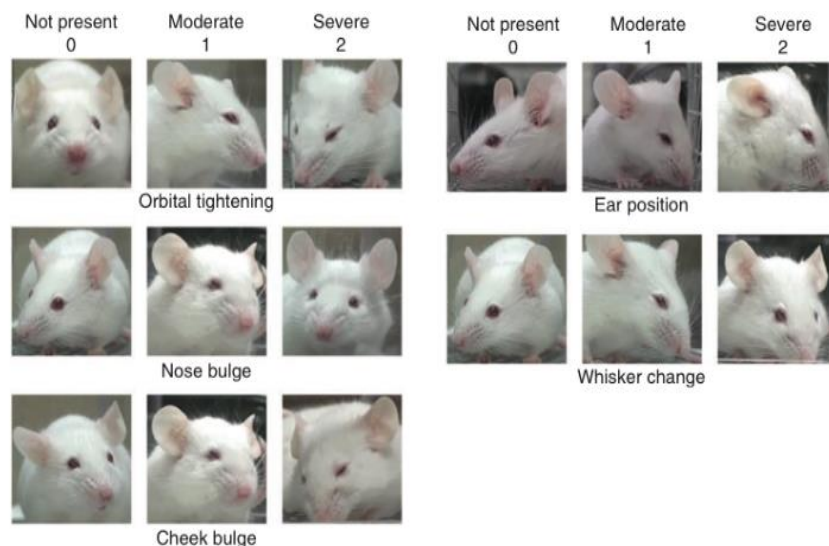


Figura 1: *Mouse Grimace Scale*. Fuente: Langford *et al.* 2010.

Análisis estadístico: Primero se realizó un análisis descriptivo de los datos, determinando media y desviación estándar. También se calculó el coeficiente de variación de cada conducta para determinar la dispersión relativa de ésta para cada tratamiento y tiempo del ensayo. Luego se comparó entre tiempos (pre, post-1, post-2) dentro de un mismo tratamiento (grupo placebo, grupo control positivo o grupo droga en estudio). También se hizo una comparación entre tratamientos (grupo placebo, grupo control positivo y grupo droga en estudio) dentro de un mismo tiempo (todos los pre, post-1 o los post-2). Para analizar estos datos, primero fue necesario realizar una prueba de Shapiro Wilk para determinar la distribución de los datos, una vez obtenido esto se utilizó una prueba de Análisis de Varianza (ANDEVA) para los datos con distribución paramétrica y la prueba de Kruskal-Wallis para los datos con distribución no paramétrica.

En el caso de los puntajes que se obtuvieron de la expresión facial a través de la *MGS* se compararon iguales tiempos entre tratamientos y se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis. En todos los casos mencionados se trabajó con un nivel de significancia de ($p < 0,05$). Para el análisis estadístico se utilizó el software Statistics 8.0® (2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparación dentro de tratamientos entre tiempos (Tablas 2, 3 y 4).

Cuando comparamos los resultados del registro conductual de un mismo tratamiento entre tiempos (Tablas 2 y 3) podemos ver que, en todos los grupos de tratamientos, independiente del que hayan recibido, hubo un aumento significativo de dos conductas asociadas a dolor inmediatamente posterior a la inoculación (post-1): lamerse la cola y permanecer en estación. En un estudio realizado por Leach *et al.* (2012), donde se evaluó el dolor en ratones pre y posterior a una vasectomía, se observó que la conducta de lamerse la herida solo apareció en el post operatorio inmediato, al igual que en el estudio de Molony y Kent (1997), en donde aparecieron conductas, como la de lamerse la herida, en animales de granja que fueron castrados. En el caso de la conducta de permanecer en estación, ésta ha sido descrita por Gaynor y Muir (2009) y Molony y Kent (1997) quienes han reportado que los animales adquieren una postura inmóvil voluntaria cuando experimentan dolor. Por lo tanto, de acuerdo con estos cambios conductuales se evidencia que existió algún grado de dolor o molestias en el sitio de inyección en todos los grupos de ratones independiente del tratamiento que hayan recibido.

Podemos observar que en el tratamiento placebo y en el tratamiento control positivo del grupo A, hay conductas activas como escalar, explorar y trasladarse, entre otras (Tabla 2), que disminuyen a través de los tiempos pre, post-1 y post-2 haciéndose significativamente menores en el post-1 y/o post-2. En el estudio de Short (1998) se señala que uno de los cambios que tienen los animales como respuesta a injurias o estímulos nocivos es la disminución en su rendimiento, por lo que podemos deducir que esta baja en la actividad física se debe al dolor o molestia que provoca la inyección. También se observa en estos grupos la disminución significativa de las conductas de comer y beber (Tabla 2) desde el post-1 y/o en el post-2. De acuerdo a Driessen y Zarucco (2007) cuando los animales experimentan dolor los intentos por alimentarse se ven disminuidos. Estos cambios conductuales, reforzarían el hecho que los individuos de estos dos grupos experimentaron dolor por la inyección. En el tratamiento placebo del grupo B hay aumento significativo de las conductas activas en el post-1 (Tabla 3) y a pesar de que este cambio conductual no se asocia a dolor, ya que, según Pritchett *et al.* (2003) los animales que experimentan dolor

disminuyen su actividad física, cabe recordar que, como se señaló al comienzo, aquí también hubo un aumento significativo de las conductas de lamerse la cola y permanecer en estación (Tabla 2), conductas que si se asocian a dolor (Gaynor y Muir, 2009; Leach *et al.*, 2012; Molony y Kent, 1997). Por lo tanto, en el tratamiento placebo del grupo B, también se evidencia dolor o malestar por la inyección, pero menos intenso que en los otros tratamientos ya que no se manifestó disminución de las conductas activas. En el tratamiento control positivo del grupo B hay aumento significativo de conductas activas como comer, explorar y trasladarse en el tiempo post-1, pero disminuyen en el post-2 (Tabla 3). Todo lo contrario a lo sucedido en el post-1 del grupo A, sin embargo, en ambos grupos en el tiempo post-2 hubo disminución de conductas activas asociadas a dolor (Tablas 2 y 3). Esta disminución en la actividad de los individuos en el post-2 lo podríamos asociar a dolor (Leach *et al.*, 2012) por el tratamiento convencional (GM-CSF PEG) manifestado 24 horas después de haber sido inoculado a los animales. Existen diversos estudios en donde se indica que la aplicación del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) puede tener efectos secundarios como dolor asociado a inflamación, malestar y debilidad (Arellano y Lonial, 2008; Nicol *et al.*, 2018).

Cuando observamos el tratamiento de la droga en estudio del grupo A, vemos que hay aumento significativo de conductas activas como comer y explorar, entre otras, en el tiempo post-1 (Tabla 2). Este cambio conductual no se puede asociar a dolor, ya que, según Pritchett *et al.* (2003) y Short (1998) se ve una disminución en la actividad física y rendimiento en los animales que experimentan dolor, además, Gaynor y Muir (2009) señalan que también disminuye su apetito. Sin embargo, si existió un aumento significativo de las conductas de lamerse la cola y permanecer en estación (Gaynor y Muir, 2009; Leach *et al.*, 2012; Molony y Kent, 1997), por lo que podemos deducir que los individuos si experimentaron dolor por la inyección, pero no tan intenso como para manifestarlo a través de una disminución en su actividad física. En el tratamiento de la droga en estudio del grupo B (tabla 3), ocurre algo distinto, ya que disminuye significativamente la conducta de acicalarse, la cual tiene un comportamiento contrario a lo que plantea Leach *et al.* (2012) en su estudio en donde esta conducta aumentó en los individuos posterior a una vasectomía, asociándose a dolor. Al igual que en el grupo A, el dolor experimentado por la inyección se manifestó solo con el aumento de las conductas de lamerse la cola y permanecer en estación. A pesar de esto, en el grupo

del tratamiento de la droga en estudio se puede ver que en el post-2 hay una disminución significativa de las conductas activas en los individuos del grupo A y, en el grupo B, también hay una disminución leve de estas conductas que no es significativa (Tablas 2 y 3), aun así, podemos observar que se repite el mismo comportamiento que en el grupo A. Esta disminución del rendimiento de los individuos se puede asociar a una manifestación de dolor (Leach *et al.*, 2012; Pritchett *et al.*, 2003) por el medicamento ENDO T 24 horas después de su inoculación. Esta situación nos hace pensar que, si hubiésemos tenido a los individuos por más tiempo en observación, tal vez las manifestaciones de dolor hubiesen seguido apareciendo, lo que indicaría que la droga podría generar dolor en el largo plazo.

Cabe señalar, que en todos los grupos de tratamientos se puede observar un aumento significativo en la conducta social de los individuos en el tiempo post-1, se podría explicar por la manipulación que sufren en este periodo para ser inyectados. La manipulación podría impregnarlos con distintos olores que los lleven a olfatearse más al recuperar el contacto social una vez que son ingresados nuevamente a la jaula.

A pesar de todo lo señalado anteriormente, cuando analizamos los resultados de la evaluación de las expresiones faciales de los individuos (Tabla 4) podemos observar que no hay diferencias significativas entre los tiempos pre, post-1 y post-2 en los grupos del tratamiento placebo y del tratamiento convencional. Al contrario, en el grupo del tratamiento de la droga en estudio hay un aumento significativo del puntaje de la *MGS* en el post-2. Estos resultados son contradictorios a los reportados por Leach *et al.* (2012), en donde las conductas de dolor post vasectomía, como lamerse la herida o trasladarse están correlacionadas, de manera positiva y negativa respectivamente, con el incremento en la puntuación de la *MGS*. Esto puede deberse a que, si bien la sola inyección de los distintos tratamientos es suficiente para generar cambios conductuales, no es tan intenso el dolor como para generar cambios en la expresión facial de los animales. La única diferencia significativa que se observa es en el grupo del tratamiento de la droga en estudio en el tiempo post-2, en donde aumenta el promedio de los puntajes obtenidos de la última imagen (Tabla 3). Como también hubo cambios conductuales asociados a dolor en este periodo, esto podría deberse a que el ENDO T genera dolor de manera retardada a partir de las 24 horas post inyección. Sin embargo, hay que recordar que el puntaje máximo a obtener por un individuo en la escala de expresión

facial es 10 y, a pesar de la que la diferencia en la imagen 5 en el tiempo post-2 es significativamente mayor respecto a los otros tiempos, aún sigue siendo baja (Tabla 4). Por lo tanto, es necesario realizar más estudios al respecto, con una duración experimental más prolongada a la utilizada en este estudio para poder determinar si efectivamente el dolor aparece de forma tardía.

Tabla 2: Promedio, desviación estándar entre paréntesis y el coeficiente de variación (C.V) de las conductas, en el primer grupo de ratones sometido al experimento (grupo A). Comparación entre tiempos dentro de un mismo tratamiento y sus respectivos valores “p” de manera vertical, y la comparación entre los tratamientos dentro de un mismo tiempo y sus respectivos valores “p” de manera horizontal.

CONDUCTA	Grupo A	Placebo	C.V	Control positivo	C.V	Droga en estudio	C.V	p-value
COMER (o)	Pre	41(17,08) ^a	0,42	129,2(99,8) ^a	0,77	43,2(12,4) ^b	0,29	0,220
	Post-1	24,3(15,8) ^{a/z}	0,65	0,4(0,9) ^{b/x}	2,25	269,2(162,4) ^{a/z}	0,60	<0,001
	Post-2	0 ^{b/z}	0,00	11,6(17,7) ^{ab/zx}	1,53	35,2(37,0) ^{b/x}	1,05	<0,001
	p-value	<0,001		<0,001		<0,001 ^o		p-value
BEBER (o)	Pre	4,1(3,28) ^{a/z}	0,80	38,9(34,7) ^{a/x}	0,89	23,1(20,3) ^{b/zx}	0,88	<0,001*
	Post-1	1,2(1,8) ^{ab/z}	1,50	0,3(0,6) ^{b/z}	2,00	175,5(70,8) ^{a/x}	0,40	<0,001
	Post-2	0,4(1,2) ^{b/z}	3,00	1,8(3,4) ^{b/zx}	1,89	8,9(8,0) ^{b/x}	0,90	<0,001
	p-value	<0,001		<0,001		<0,001 ^o		p-value
DORMIR (s)	Pre	3727,6(329,1) ^{ab/z}	0,09	1691,4(1922,2) ^z	1,14	3769,3(849,2) ^{a/x}	0,23	0,047
	Post-1	2999,3(334,5) ^b	0,11	4049,29(278,7)	0,07	756,9(257,0) ^c	0,34	0,817*
	Post-2	4484,8(1677,8) ^{a/z}	0,37	3188,0(2270,9) ^{zx}	0,71	2482,8(1523,4) ^{b/x}	0,61	0,006
	p-value	<0,001		0,124		<0,001 ^o		p-value
ESCALAR (s)	Pre	104,1(57,5) ^a	0,55	70,2(77,8) ^a	1,11	274,1(243,7) ^a	0,89	0,122
	Post-1	7,6(14,2) ^{b/zx}	1,87	5,5(14,17) ^{b/z}	2,58	31,2(31,54) ^{ab/x}	1,01	0,049
	Post-2	0 ^{b/z}	0,00	16,1(19,2) ^{ab/x}	1,19	8,7(11,1) ^{b/x}	1,28	0,022
	p-value	<0,001		0,011		0,019		p-value
ESCARBAR (o)	Pre	73,5(23,4) ^{a/z}	0,32	208,9(172,5) ^{a/x}	0,83	93,2(53,7) ^{ab/zx}	0,58	<0,001*
	Post-1	56,9(20,4) ^{a/zx}	0,36	30,2(13,3) ^{ab/z}	0,44	112,5(62,3) ^{a/x}	0,55	<0,001*
	Post-2	5(8,9) ^{b/z}	1,78	28(39,7) ^{b/zx}	1,42	54,3(71,9) ^{b/x}	1,32	0,003
	p-value	<0,001		0,014		0,037		p-value
EXPLORAR (o)	Pre	295,7(45,0) ^{a/z}	0,15	741,2(606,3) ^{a/x}	0,82	220,1(101,7) ^{b/z}	0,46	<0,001*
	Post-1	196,3(59,9) ^{b/z}	0,31	233,3(110,3) ^{b/x}	0,47	562,4(142,1) ^{a/x}	0,25	0,001*
	Post-2	13,9(14,5) ^{c/z}	1,04	98,2(80,5) ^{b/x}	0,82	94,4(71,9) ^{b/x}	0,76	0,001*
	p-value	0,001 ^o		<0,001 ^o		0,003 ^o		p-value
TRASLADARSE (o)	Pre	100,6(31,9) ^{a/zx}	0,32	197,5(146,5) ^{a/z}	0,74	80,5(49,1) ^{a/x}	0,61	<0,001*
	Post-1	84,6(26,2) ^a	0,31	74,7(36,6) ^a	0,49	132,8(36,4) ^a	0,27	0,109*
	Post-2	2,6(3,8) ^{b/z}	1,46	19,2(14,7) ^{b/zx}	0,77	26,1(20,2) ^{b/x}	0,77	0,014
	p-value	<0,001		0,001		0,021 ^o		p-value
EN ESTACIÓN (s)	Pre	119,7(70,2) ^b	0,59	204,1(147,8)	0,72	203,9(162,8) ^b	0,80	0,055*
	Post-1	1079,4(391,9) ^{a/z}	0,36	333,6(159,1) ^x	0,48	976,6(329,5) ^{a/z}	0,34	0,018*
	Post-2	60,9(86,9) ^b	1,43	120,5(123,2)	1,02	124,7(128,5) ^b	1,03	0,525
	p-value	<0,001		0,747 ^o		<0,001 ^o		p-value
ACICALARSE (s)	Pre	84,3(92,8)	1,10	132,9(124,7)	0,94	58,3(67,8)	1,16	0,403
	Post-1	32,15(24,9) ^z	0,77	120,2(123,5) ^{zx}	1,03	160,8(111,6) ^x	0,69	<0,001*
	Post-2	68,7(83,7)	1,22	104,8(189,8)	1,81	70,9(95,2)	1,34	0,808
	p-value	0,400		0,360		0,146		p-value
SOCIABILIZAR (o)	Pre	5(3,3) ^{b/z}	0,66	15,7(16,3) ^{ab/x}	1,04	13,4(10,8) ^{ab/x}	0,81	<0,001*
	Post-1	18,8(5,9) ^{a/z}	0,31	34(17,0) ^{a/zx}	0,50	52,7(28,7) ^{a/x}	0,54	<0,001*
	Post-2	0 ^{c/z}	0,00	2,3(2,9) ^{b/x}	1,26	2,4(3,1) ^{b/x}	1,29	0,013
	p-value	<0,001		<0,001		<0,001		p-value
LAMERSE LA COLA (o)	Pre	0 ^b	0,00	0,3(0,9) ^{bb}	3,00	0,2(0,6) ^a	3,00	0,611
	Post-1	6,3(6,6) ^{a/z}	1,05	0,8(0,9) ^{a/x}	1,13	2(3) ^{a/zx}	1,50	0,012
	Post-2	0 ^b	0,00	0 ^b	0,00	0 ^a	0,00	<0,001
	p-value	<0,001		0,016		0,037		p-value
FUERA DE VISTA (s)	Pre	1031,0(338,6) ^{zx}	0,33	1417,9(1383,38) ^z	0,98	728,9(211,1) ^{b/x}	0,29	0,044
	Post-1	864,1(466,6) ^z	0,54	1003,3(180,4) ^{zx}	0,18	1228,6(546,2) ^{ab/x}	0,44	0,003*
	Post-2	1134,9(1730,4)	1,52	2248,2(2607,2)	1,16	1360,5(699,2) ^a	0,51	0,276
	p-value	0,403		0,688		0,004 ^o		p-value

s= segundos; o= número de ocurrencias. Letras a, b y c denotan diferencias significativas para la conducta entre tiempos en un mismo tratamiento; letras z y x denotan diferencias significativas para la conducta entre tratamientos en un mismo tiempo.

^oDenota uso de prueba ANDEVA para la conducta entre los distintos tiempos; *Denota uso de prueba ANDEVA para la conducta entre los distintos tratamientos. Fuente: Creación propia.

Tabla 3: Promedio, desviación estándar entre paréntesis y el coeficiente de variación (C.V) de las conductas, en el segundo grupo de ratones sometido al experimento (grupo B). Comparación entre tiempos dentro de un mismo tratamiento y sus respectivos valores “p” de manera vertical, y la comparación entre los tratamientos dentro de un mismo tiempo y sus respectivos valores “p” de manera horizontal.

CONDUCTA	Grupo B	Placebo	C.V	Control positivo	C.V	Droga en estudio	C.V	p-value
COMER (o)	Pre	38,9(73,1) ^{zx}	1,88	5,3(8,5) ^{b/z}	1,60	30(16,0) ^{a/x}	0,53	0,005
	Post-1	31,8(33,7)	1,06	28,6(18,2) ^a	0,64	12,3(8,3) ^{ab}	0,67	0,098
	Post-2	6,6(9,3)	1,41	7,4(6,6) ^b	0,89	9,1(11,5) ^b	1,26	0,909
	p-value	0,103		<0,001		0,006		p-value
BEBER (o)	Pre	5,9(8,1)	1,37	0,8(1,4)	1,75	2,6(2,4)	0,92	0,307
	Post-1	0,4(0,6)	1,50	1,3(2,1)	1,62	1,7(2,5)	1,47	0,715
	Post-2	0,8(1,6)	2,00	2,8(3,28)	1,17	1,2(2,4)	2,00	0,222
	p-value	0,186		0,523		0,328		p-value
DORMIR (s)	Pre	4408,7(1186,5) ^{zx}	0,27	5147,5(505,3) ^{a/z}	0,10	4030,7(789,0) ^{a/x}	0,20	0,009
	Post-1	1466,6(771,3)	0,53	2143,1(397,9) ^b	0,19	2418,0(646,1) ^b	0,27	0,170*
	Post-2	3612,1(703,7)	0,19	3159,3(682,8) ^b	0,22	3863,4(657,4) ^a	0,17	0,093
	p-value	0,242°		<0,001		<0,001		p-value
ESCALAR (s)	Pre	107,6(131,7) ^{ab}	1,22	21,9(38,5)	1,76	83,9(90,6)	1,08	0,178
	Post-1	190,1(114,0) ^{a/z}	0,60	51,4(47,6) ^x	0,93	56,5(76,3) ^x	1,35	0,001
	Post-2	19,9(34,2) ^b	1,72	16,3(15,8)	0,97	25,1(28,6)	1,14	0,719
	p-value	<0,001		0,094		0,381		p-value
ESCARBAR (o)	Pre	43,8(32,2) ^{a/z}	0,74	16,9(9,1) ^{b/z}	0,54	84,7(35,7) ^x	0,42	0,001*
	Post-1	123,8(76,7) ^{b/zx}	0,62	87(65,9) ^{a/z}	0,76	147,9(27,9) ^x	0,19	0,030
	Post-2	103,4(89,2) ^b	0,86	90(77,3) ^a	0,86	74,3(50,1)	0,67	0,251*
	p-value	0,019°		0,002		0,230°		p-value
EXPLORAR (o)	Pre	194,5(138,8) ^{b/z}	0,71	84,6(62,7) ^{b/x}	0,74	180,8(70,9) ^x	0,39	0,035*
	Post-1	567(301,7) ^{a/z}	0,53	537,1(176,4) ^{a/z}	0,33	332,9(66,4) ^x	0,20	<0,001*
	Post-2	105,2(91,2) ^b	0,87	128,1(91,9) ^b	0,72	104,3(65,8)	0,63	0,565*
	p-value	0,002°		0,009°		0,971°		p-value
TRASLADARSE (o)	Pre	65,4(51,8) ^b	0,79	27,3(25,3) ^b	0,93	53,4(28,8)	0,54	0,670*
	Post-1	176,1(84,6) ^{a/z}	0,48	144,6(52,9) ^{a/zx}	0,37	83,6(18,8) ^x	0,22	<0,001*
	Post-2	25,7(22,8) ^b	0,89	31(23,15) ^b	0,75	18,7(12,6)	0,67	0,177*
	p-value	0,002°		0,022°		0,061°		p-value
EN ESTACIÓN (s)	Pre	140,6(29,2) ^b	0,21	105,3(83,6) ^b	0,79	154,5(81,5) ^{ab}	0,53	0,293*
	Post-1	911,4(353,5) ^a	0,39	870,6(241,9) ^a	0,28	364,5(231,8) ^a	0,64	0,373*
	Post-2	195,5(157,7) ^b	0,81	235,7(235,6) ^b	1,00	107,8(207,7) ^b	1,93	0,139
	p-value	0,005°		<0,001		<0,001		p-value
ACICALARSE (s)	Pre	269,2(316,5)	1,18	147,4(254,9)	1,73	175,5(121,8) ^a	0,69	0,190
	Post-1	107,9(60,8) ^z	0,56	153,7(90,4) ^z	0,59	37,7(19,7) ^{ab/x}	0,52	<0,001
	Post-2	153,1(207,5)	1,36	67,7(19,1)	0,28	53,7(70,6) ^b	1,31	0,873
	p-value	0,615		0,056		0,015		p-value
SOCIABILIZAR (o)	Pre	2,2(1,9) ^{b/zx}	0,86	0,8(0,9) ^{b/z}	1,13	10,6(7,2) ^{ab/x}	0,68	0,003
	Post-1	16,9(87,6) ^{a/zx}	5,18	10,3(6,5) ^{a/z}	0,63	22,2(9,9) ^{a/x}	0,45	0,034
	Post-2	1,9(1,9) ^b	1,00	0,98(0,9) ^b	0,92	1,4(2,7) ^b	1,93	0,423
	p-value	<0,001		<0,001		<0,001		p-value
LAMERSE LA COLA (o)	Pre	0,3(0,9) ^{ab}	3,00	0,4(0,9)	2,25	0,2(0,6) ^{ab}	3,00	0,789
	Post-1	0,7(0,7) ^a	1,00	1,1(2,1)	1,91	1,6(3,2) ^a	2,00	0,936
	Post-2	0 ^b	0,00	0	0,00	0 ^b	0,00	<0,001
	p-value	0,016		0,088		0,012		p-value
FUERA DE VISTA (s)	Pre	383,1(253,3) ^{zx}	0,66	208,6(151,6) ^{b/z}	0,73	771,6(371,6) ^{b/x}	0,48	<0,001
	Post-1	1268,8(529,4)	0,42	1215,9(411,8) ^a	0,34	1859,1(571,2) ^a	0,31	0,623*
	Post-2	792,3(348,1)	0,44	1328,7(348,4) ^a	0,26	907,1(353,9) ^b	0,39	0,998*
	p-value	0,098°		0,022°		<0,001		p-value

s= segundos; o= número de ocurrencias. Letras a, b y c denotan diferencias significativas para la conducta entre tiempos en un mismo tratamiento; letras z y x denotan diferencias significativas para la conducta entre tratamientos en un mismo tiempo.

°Denota uso de prueba ANDEVA para la conducta entre los distintos tiempos; *Denota uso de prueba ANDEVA para la conducta entre los distintos tratamientos. Fuente: Creación propia.

Tabla 4: Promedio del puntaje total obtenido por la evaluación de las expresiones faciales en cada una de las 5 imágenes obtenida de las videograbaciones y la comparación de ello entre grupos de igual tratamiento entre distintos tiempos.

Control positivo				
	pre	post1	post2	p-value
Foto1	1,938	1,3	1,857	0,3693
Foto2	1,385	1,3	2,417	0,0607
Foto3	1,14	1,55	2,29	0,132
Foto4	1,63	1,47	2,13	0,4675
Foto5	1,5	1,389	1,4	0,9382
Droga en estudio				
	pre	post1	post2	p-value
Foto1	1,6	1,5	1,3	0,6595
Foto2	2	1,67	1,78	0,7216
Foto3	2,5	1,4	2,1	0,0971
Foto4	1,571	2,105	1,778	0,3905
Foto5	1,1 ^b	1,2 ^b	3,2 ^a	0,0112
Placebo				
	pre	post1	post2	p-value
Foto1	0,941	1,25	1,333	0,531
Foto2	0,9	1,3	1,6	0,5591
Foto3	2	1,4	2,143	0,2874
Foto4	1,64	1,9	2	0,7207
Foto5	1,7	1,4	1,7	0,7141

Fuente: Creación propia.

Comparación entre tratamientos dentro del mismo tiempo (Tablas 2, 3 y 5).

Cuando analizamos los resultados de la comparación entre grupos en igual tiempo, podemos observar que en el tiempo pre del grupo A los individuos del tratamiento control positivo tienen frecuencias de conductas activas significativamente más altas que los individuos de los otros dos tratamientos (Tabla 2). Por su lado, el grupo de la droga en estudio y del tratamiento placebo tienen frecuencias menores de conductas como trasladarse o beber respectivamente. Estas diferencias pueden estar dadas por distintas individualidades en cada grupo, siendo los individuos del tratamiento control positivo más activos. En el grupo B sucede lo contrario, habiendo conductas como comer y explorar con frecuencias menores en el grupo del tratamiento control positivo en comparación a los otros dos tratamientos, por lo

que en el grupo B, los individuos del tratamiento control positivo son menos activos que los individuos de los otros tratamientos (Tabla 3). En el tiempo pre, los individuos estuvieron bajo las mismas condiciones y, como el comportamiento de los ratones está influenciado por factores genéticos y ambientales (Meer y Raber, 2005) podemos asumir que la diferencia evidenciada entre los grupos se debe a diferencias individuales propias de los ratones. En el tiempo post-1 se observa que los individuos del tratamiento control positivo del grupo A tuvieron conductas activas como escalar y escarbar (Tabla 2) con frecuencias significativamente menores en comparación con los otros dos grupos de tratamientos. Este comportamiento nos podría indicar que en este grupo los individuos experimentaron más dolor en comparación con los otros tratamientos, ya que, según Pritchett *et al.* (2003) los individuos que experimentan dolor disminuyen su actividad física. Por otro lado, los otros dos grupos tienen frecuencias mayores de las conductas de comer y beber en comparación al tratamiento control positivo (Tabla 2), conductas que son menos frecuentes cuando los animales experimentan dolor (Driessen y Zarucco, 2007; Gaynor y Muir, 2009). Sin embargo, los individuos que recibieron el medicamento ENDO T y el suero fisiológico permanecieron en estación y se lamieron la cola muchas más veces que los individuos del tratamiento control positivo, conductas asociadas a dolor (Leach *et al.*, 2012). De acuerdo con lo anterior, podemos plantear que los tres grupos de tratamientos experimentaron dolor por la inyección, pero con distinta intensidad, ya que en el grupo del tratamiento control positivo los individuos estuvieron menos activos que los otros individuos, por lo que el dolor experimentado pudo ser mayor. En el grupo B, en el post-1 los individuos sometidos a los tres tratamientos también tuvieron comportamientos que podrían asociarse a dolor, como pasar más tiempo acicalándose en el caso del grupo placebo y control positivo o movilizándose menos como es en el caso del grupo de la droga en estudio (Tabla 3). Este comportamiento evidenciaría que los animales si experimentaron dolor, ya que, según el estudio de Leach *et al.* (2012) en donde sometió a ratones a una vasectomía, los individuos realizan menos actividad física y pasaron más tiempo acicalándose en el post operatorio, asociándose este comportamiento a dolor. Sin embargo, los tres grupos tienen conductas activas como escarbar o explorar con frecuencias altas (Tabla 4) lo que no se condice con lo publicado por Short (1998), quien señala que hay una menor actividad física en los animales que experimentan dolor. De acuerdo con la información obtenida, podemos decir que aquí,

al igual que en el grupo A, los individuos de los tres tratamientos experimentaron dolor o molestias por la inyección, pero fue manifestado a través de diferentes cambios conductuales. También se puede ver que tanto en el grupo A como en el grupo B del tiempo post-1, los individuos del tratamiento control positivo tienen mayores cambios conductuales asociados a dolor, el cual podría ser atribuido a la inyección, pero también podría influir el tratamiento convencional (GM-CSF PEG) inoculado. Se ha visto que la aplicación GM-CSF por diversos tratamientos puede tener efectos secundarios como dolor por inflamación (Arellano y Lonial, 2008; Nicol *et al.*, 2018). En el tiempo post-2 se encuentran diferencias significativas entre los individuos del tratamiento placebo respecto a los individuos de los otros dos tratamientos del grupo A. Aquí los individuos que recibieron el tratamiento control positivo o el ENDO T tuvieron frecuencias mayores de conductas activas, como explorar y escalar, entre otras, que los individuos que recibieron el suero fisiológico (Tabla 2). De acuerdo con esto podemos señalar que el grupo placebo tuvo más conductas asociadas a dolor en el post-2 en comparación con los otros grupos (Driessen y Zarucco, 2007; Leach *et al.*, 2012; Pritchett *et al.*, 2003).

Al analizar los resultados de la evaluación de las expresiones faciales de los individuos (Tabla 5) (Figura 2) se observa que no hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos en los tiempos post-1 y post-2. Por lo que el cambio conductual asociado a dolor que se pudo haber producido en estos tiempos, no se correlaciona con la puntuación de la *MGS*, como señala Leach *et al.* (2012). Por lo tanto, podemos decir que el dolor experimentado por los individuos solo generó leves cambios conductuales. Se puede observar una leve diferencia significativa en la segunda imagen del tiempo pre, sin embargo, como en ese periodo los individuos no estaban bajo algún tratamiento, esta discrepancia la podemos atribuir a diferencias propias de cada individuo (Meer y Raber, 2005).

Tabla 5: Promedio del puntaje total obtenido por la evaluación de las expresiones faciales en cada una de las 5 imágenes obtenida de las videograbaciones y la comparación de ello entre grupos de igual tiempo entre distintos tratamientos.

Pre				
	tto control	tto placebo	tto droga	p-value
Foto1	1,938	0,941	1,6	0,1332
Foto2	1,385 ^a	0,9 ^a	2 ^a	0,0429
Foto3	1,14	2	2,5	0,1684
Foto4	1,63	1,64	1,571	0,875
Foto5	1,5	1,7	1,1	0,6522
Post 1				
	tto control	tto placebo	tto droga	p-value
Foto1	1,3	1,25	1,5	0,4965
Foto2	1,3	1,3	1,67	0,6719
Foto3	1,55	1,4	1,4	0,7749
Foto4	1,47	1,9	2,105	0,2931
Foto5	1,389	1,4	1,2	0,9249
Post 2				
	tto control	tto placebo	tto droga	p-value
Foto1	1,857	1,333	1,3	0,5021
Foto2	2,417	1,6	1,78	0,414
Foto3	2,29	2,143	2,1	0,9795
Foto4	2,13	2	1,778	0,8297
Foto5	1,4	1,7	3,2	0,0592

Fuente: Creación propia.



Figura 2: Ilustraciones obtenidas de las videograbaciones del grupo A en el tiempo post-1, en donde se puede observar diferencias en la posición de sus orejas. De izquierda a derecha: el primer individuo recibió el tratamiento placebo, el segundo el tratamiento control positivo y el tercero el tratamiento en estudio. Fuente: creación propia.

CONCLUSIÓN

El análisis del comportamiento y de las expresiones faciales de cada individuo tras la inyección de los tres tratamientos resultó en cambios significativos para algunas conductas. Al comparar entre tiempos, hubo conductas en el tiempo post-1 que aumentaron significativamente en todos los grupos sin importar el tratamiento recibido, como lamerse la cola y permanecer en estación, las cuales pueden ser asociadas a dolor por la inyección propiamente tal. También hubo disminución de conductas activas como trasladarse y explorar en el post-1 y post-2 en los tres grupos, lo cual también es asociado a dolor. Sin embargo, al analizar la evaluación de las expresiones faciales de los individuos no hay cambios significativos entre los tiempos. Por lo tanto, podemos decir que la inyección generó dolor o molestias en los individuos el cual fue manifestado a través de diferentes cambios conductuales, independiente del tratamiento que hayan recibido, pero no fue un dolor suficientemente intenso como para generar cambios en la *MGS*. En el grupo ENDO T, en el tiempo post-2, se puede observar que hay una diferencia significativa con los otros tiempos para la *MGS*. Estos cambios sugieren que ENDO T podría iniciar una respuesta dolorosa retardada a partir de las 24 horas de inoculada.

El aumento de la conducta de sociabilizar en todos los grupos en el post-1, podría deberse a la manipulación que tuvieron los individuos en ese periodo para la inoculación, gatillando una respuesta de exploración y reconocimiento entre ellos.

Al comparar entre los tratamientos se pudo observar que los tres grupos manifestaron dolor a través de diferentes cambios conductuales en el tiempo post-1, inmediatamente posterior a la inyección, y en el tiempo post-2 hubo frecuencias menores de conductas activas en el grupo placebo en comparación a los otros tratamientos. A pesar de ello, al analizar la *MGS* no hay diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que el dolor o molestia experimentada por los grupos solo se manifestó a través de cambios conductuales.

Por lo tanto, podemos concluir que la inoculación parenteral del medicamento ENDO T no genera dolor al momento de su aplicación, más allá del dolor asociado a la inyección. Sin embargo, es necesario realizar más estudios al respecto, con duraciones experimentales más prolongadas, para poder determinar el efecto de la droga en los individuos posterior a las 24hrs de su inoculación.

BIBLIOGRAFÍA

AIGÉ, V., CRUZ, J. 2001. El dolor en los pequeños animales: bases neuroanatómicas, reconocimiento y tratamiento. *Consulta Difus. Vet.* 9(78): 63-70.

ARELLANO, M., LONIAL, S. 2008. Clinical uses of GM-CSF, a critical appraisal and update. *PubMed.* 2(1): 13-27.

DALLACOSTA, E.; MINERO, M.; LEBELT, D.; STUCKE, D.; CANALI, E.; LEACH, M. 2014. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. *PLOSone.* 9(3).

DRIESSEN, B., ZARUCCO, L. 2007. Pain: From diagnosis to effective treatment. **In:** Driessen, B. *Clinical techniques in equine practice.* 2ª ed. Board. pp 126-134.

GAYNOR, J., MUIR, W. 2009. Pain behaviors. **In:** *Handbook of veterinary pain management.* 2ª ed. Mosby. pp. 65-81.

LANGFORD, D.; BAILEY, A.; CHANDA, M; CLARKE, S.; DRUMMOND, T.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R.; SOTOCINAL, S.; TABAKA, J.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A.; FERRARI, M.; CRAIG, K.; MOGIL, J. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7(6): 447-449.

LEACH, M., KLAUS, K., MILLER, A., SCOTTO, M., SOTOCINAL, S., FLECKNELL, P. 2012. The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLOSone.* 7(4):1-9.

LEARY, S., UNDERWOOD, W., ANTHONY, R., CARTNER, S., COREY, D., GRANDIN, T., GREENACRE, C., GWALTNEY, S., MCCRACKIN, M., MEYER, R., MILLER, D., SHEARER, J., YANONG, R. 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association. 48-50pp.

LÓPEZ, A., ITURRALDE, F., CLERENCIA, M., ORTIZ, J. s/f. Dolor. [en línea]. España. cap. 71. **In:** *Tratado de Geriátría para Residentes.* <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-doc/dolor_1.pdf> [consulta:01-04-2018].

MAROVAC, J. 2001. Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Rev Med Chile.* 129(1): 99-106.

MATSUMIYA, L., SORGE, R., SOTOCINAL, S., TABAKA, J., WIESKOPF, J., ZALOUM, A., KING, O., MOGIL, J. 2012. Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 51(1):42-49.

MEER, P., RABER, J. 2005. Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochem. J.* 389(3): 593-610.

MOLONY, V., KENT, J. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.* 75:266-272.

NICOL, L., THORNTON, P., HATCHER, J., GLOVER, C., WEBSTER, C., BURRELL, M., HAMMETT, K., JONES, C., SLEEMAN, M., BILLINTON, A., CHESSELL, I. 2018. Central inhibition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is analgesic in experimental neuropathic pain. PubMed. 159(3): 550-559.

OBSERVER XT. 2011. Noldus Information Technology. The Netherlands.

OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2015. Bienestar animal. [en línea] <http://www.oie.int/es/bienestar-animal/el-bienestar-animal-de-un-vistazo/> [consulta:15-05-2018].

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. 2011. Terrestrial Animal Health Code. 20th ed. OIE. v.1.

PRITCHETT, L., ULIBARRI, C., ROBERTS, M., SCHNEIDER, R., SELLON, D. 2003. Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic. Appl Anim Behav Sci. 80:31-43.

RUSSELL, W.; BURCH, R. 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen, London, U.K. 238 p.

SHORT, C. 1998. Fundamentals of pain perception in animals. Appl Anim Behav Sci. 59:125-133.

STATISTICS 8.0. 2003. Analytics Software, Tallahassee, USA.

TANNENBAUM, J., BENNETT, B. 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. J Am Assoc Lab Anim Sci. 54(2): 120-132.

WEARY, D.; NIEL, L.; FLOWER, F.; FRASER, D. 2006. Identifying and preventing pain in animals. Appl Anim Behav Sci. 100: 64-76.

Anexo 1: Certificado CICUA.



Santiago, a 26 de junio de 2018

Certificado n°: **18176- VET-UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: **“ENDO T una nueva formulación movilizadora de células madres hematopoyéticas: Ensayo pre-clínico en un modelo murino”**, de la Investigadora Responsable **Dra. Consuelo Borie P.**, del Laboratorio de Bacteriología Veterinaria, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Veterinaria y Ciencias Pecuarias, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La Investigadora, se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de **126** ratones *Mus musculus* (cepa BALB/c), provenientes del Bioterio del Instituto de Salud Pública (ISP) ó Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC), según disponibilidad, desde julio de 2018 hasta diciembre de 2018, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **la Empresa Cellter, Nanopharmaceutics Solutions.**

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

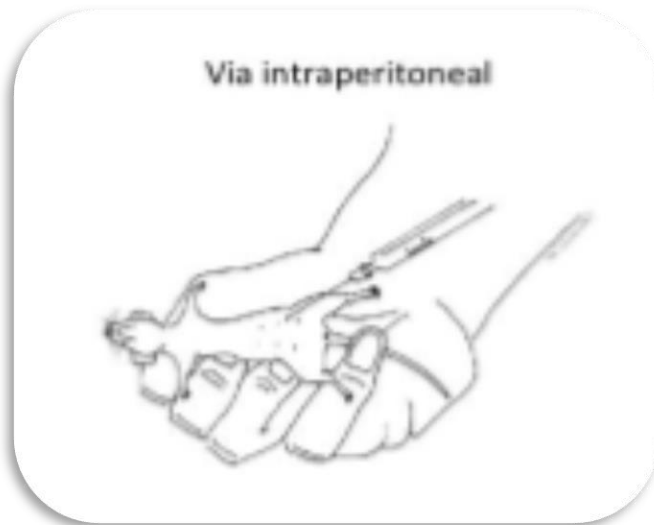
Dr. Cristián Ugaz Ruiz
Director Ejecutivo
CICUA - VID
Universidad de Chile



MV Pía Ocampos Toro
Presidente Subrogante
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

Anexo 2: Procedimiento de eutanasia realizado, de acuerdo con las directrices de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA).



La eutanasia se llevó a cabo con Tiopental sódico, vía intraperitoneal con al menos tres veces la dosis para inducir anestesia (> a 150 mg/kg). Para ello los animales fueron sostenidos como lo demuestra el dibujo. La muerte fue confirmada por ausencia de respiración, falta de reflejo al pinchar una pata y ausencia de latidos cardíacos al presionar el tórax con los dedos.

Fuente: Leary *et al.*, 2013.