



Comisión
Europea

Preocupándonos de los animales hacia una ciencia mejor

DIRECTIVA 2010/63/EU
PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS
PARA FINES CIENTÍFICOS



**DOCUMENTO MARCO PARA LA
EVALUACIÓN DE SEVERIDAD**

Índice

Documento de trabajo sobre un marco para la evaluación de la severidad	p. 2 - 24
Ejemplos para ilustrar el proceso de clasificación de la severidad, la evaluación diaria y la evaluación de la severidad real	p. 25 - 96

**Autoridades nacionales competentes en materia de aplicación de la
Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados
para fines científicos**

Documento de trabajo sobre un marco para la evaluación de la severidad

Bruselas, 11 y 12 de julio de 2012

La Comisión creó un grupo de trabajo de expertos (GTE) a fin de evaluar la severidad de los procedimientos para facilitar la aplicación de la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Se invitó a todos los Estados miembros y a las principales organizaciones de partes interesadas a que designaran expertos para participar en el grupo de trabajo.

El GTE para la evaluación de la severidad se reunió en dos ocasiones, a saber: en diciembre de 2011, para abordar el tema de los animales modificados genéticamente, y en mayo de 2012, para deliberar sobre un marco general relativo a la evaluación de la severidad real que experimentan los animales durante los procedimientos.

Este documento es el resultado del trabajo de las dos reuniones del GTE, de las deliberaciones con los Estados miembros, así como de las aportaciones jurídicas de la Comisión a la idea de un marco relativo a la evaluación de la severidad, sus elementos, participantes y herramientas y métodos de trabajo. Fue apoyado por las autoridades nacionales competentes en materia de aplicación de la Directiva 2010/63/UE en su reunión de los días 11 y 12 de julio de 2012.

Exención de responsabilidad:

El siguiente texto tiene por finalidad servir de orientación para ayudar a los Estados miembros y otros afectados por esta Directiva a llegar a un acuerdo común sobre las disposiciones que se recogen en ella. Todas las observaciones deben considerarse en el contexto de la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Únicamente el Tribunal de Justicia de la Unión Europea está facultado para interpretar el Derecho de la UE con autoridad jurídicamente vinculante.

Índice

Artículos relacionados de la Directiva 2010/63/UE	4
Contexto general.....	4
Consideraciones de carácter general para la evaluación de severidad	5
Consideraciones previas al estudio.....	7
Indicadores de severidad	9
<i>Categorías principales</i>	9
<i>Factores que deben tenerse en cuenta en la evaluación de la severidad real</i>	10
Cómo garantizar la coherencia entre la evaluación y la determinación de la severidad real	13
<i>Elaboración de una hoja de evaluación para cada procedimiento</i>	13
<i>Coherencia en la evaluación de la severidad real</i>	14
¿Quién debe hacer aportaciones para la evaluación de la severidad real?	15
Herramientas de seguimiento, medios y otras consideraciones	15
Apéndice I - Glosario de observaciones clínicas	17
Apéndice II – Textos de referencia, directrices y recursos en línea sobre la evaluación del bienestar de animales involucrados en procedimientos científicos.....	21

Artículos relacionados de la Directiva 2010/63/UE

- **Artículo 4, apartado 3:** *«Los Estados miembros velarán por el refinamiento de la cría, el alojamiento y los cuidados, así como de los métodos utilizados en procedimientos, eliminando o reduciendo al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero a los animales».*
- **Artículo 15, apartado 1:** *«Los Estados miembros velarán por que todos los procedimientos se clasifiquen como "sin recuperación", "leves", "moderados" o "severos", caso por caso, en función de los criterios de clasificación establecidos en el anexo VIII».*
- **Artículo 16, apartado 1, letra d):** *«[su reutilización] se ajusta al dictamen veterinario teniendo en cuenta la experiencia durante la vida del animal».*
- **Artículo 54, apartado 2:** *«Los Estados miembros recopilarán y publicarán cada año información estadística sobre la utilización de animales en procedimientos, incluidos datos sobre la severidad real de los procedimientos y sobre el origen y especie de los primates no humanos utilizados. [...]».*

Contexto general

La Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, exige que se realice una evaluación prospectiva de la severidad de cada procedimiento de un proyecto (artículo 15) y se asigne una clasificación de la severidad de los procedimientos, que podrán ser «sin recuperación», «leves», «moderados» o «severos». En el anexo VIII se recogen orientaciones sobre los factores que deben tenerse en cuenta al examinar la severidad prospectiva y se presentan algunos ejemplos de cada categoría de severidad.

El artículo 54, relativo a la comunicación de información, establece que debe transmitirse información estadística sobre la severidad real del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero experimentado por el animal (por oposición a la evaluación prospectiva o predicción de la severidad realizada en el momento de evaluar el proyecto). Por otra parte, la severidad real de los procedimientos anteriores será una consideración clave para determinar si un animal puede volver a utilizarse en otros procedimientos (artículo 16).

Estas medidas permitirán mejorar la calidad de la ciencia y el bienestar mediante el examen prospectivo de las propuestas de proyectos y, con la inclusión del sufrimiento real experimentado por el animal, deberían ofrecer mayor transparencia y mejor conocimiento de los efectos que tienen los procedimientos científicos en el bienestar animal. **Entre los principales beneficios de la evaluación prospectiva, el seguimiento, la evaluación y el registro de la severidad real cabe citar los siguientes:**

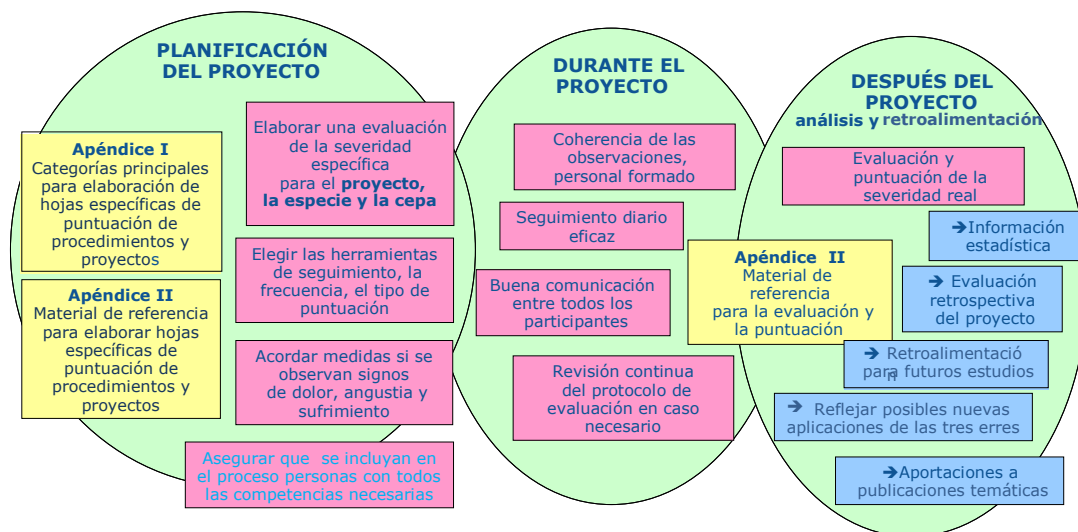
- Ofrecer oportunidades para, en particular, aplicar el refinamiento y reducir el sufrimiento, aunque las discusiones prospectivas generalmente permitirán considerar si es necesario o no utilizar animales (reemplazo) y si el diseño del estudio es adecuado para reducir al mínimo el uso de animales (reducción).

- Una mejora del bienestar animal, por ejemplo, si el sufrimiento se reconoce y se alivia antes.
- Una mayor transparencia, ya que las estadísticas reflejarían mejor el impacto real en el bienestar de los animales.
- Una mejor comunicación entre las personas encargadas del uso, el cuidado y el seguimiento de los animales.
- Información para la evaluación retrospectiva del proyecto cuando ésta se realiza (artículo 39).
- Una mejor calidad de los datos científicos gracias a un mayor bienestar de los animales.
- Mayor conocimiento para evaluar la severidad y los signos clínicos, que favorecerá una mayor coherencia en las evaluaciones siempre que se difundan las estrategias utilizadas y los resultados, por ejemplo, en publicaciones especializadas, grupos de debate y reuniones.
- Aportaciones a los cursos de formación para investigadores, técnicos y veterinarios de animales de laboratorio, si los resultados se utilizan para ofrecer ejemplos.
- Información basada en la evidencia que pueda utilizarse en evaluaciones prospectivas de los daños y beneficios que pueda emplearse en un futuro para proyectos similares.

Consideraciones de carácter general para las evaluaciones de severidad

El examen de la severidad de un procedimiento debe ser un **proceso continuo**, desde el diseño inicial del estudio, pasando por el seguimiento específico diario de los animales del estudio durante el proyecto, hasta la evaluación de la severidad «real» al finalizar el estudio, lo que ofrece la oportunidad de identificar nuevos refinamientos para futuros estudios.

EVALUACIÓN DE LA SEVERIDAD – UN PROCESO CONTINUO



Se deben desarrollar varios ejemplos del proceso de evaluación de la severidad de proyectos o procedimientos concretos, incluidas hojas de evaluación diaria, herramientas de puntuación, elección de los métodos de seguimiento y evaluación final.

Este enfoque es una forma de velar por que se tengan en cuenta y apliquen las tres erres a lo largo de todo el proceso, de que mejore la comunicación entre todos los participantes y de que se garantice la coherencia.

La evaluación real de la severidad requiere:

- **un enfoque de «equipo»**, con aportaciones de personas que cuenten con diferentes conocimientos técnicos, experiencia y prioridades, por ejemplo, investigadores, técnicos y personal encargado de cuidar a los animales, el veterinario, etc.;
- una buena planificación;
- una formación inicial y continua adecuadas para todo el personal participante;
- sistemas para evaluar la severidad día a día, adaptados a la especie, la cepa y el proyecto, que incluyan observaciones fundamentadas y estructuradas de los animales a intervalos adecuados (por ejemplo, una mayor frecuencia durante y después de los procedimientos);
- protocolos eficaces y bien fundamentados para evaluar el comportamiento y los signos clínicos;
- un análisis de las observaciones para emitir un juicio fundamentado sobre la naturaleza y el nivel de sufrimiento;
- un conocimiento de la severidad de cada procedimiento y de las medidas que deben tomarse si se alcanza o supera dicha severidad;
- un enfoque coherente de las evaluaciones generales sobre el sufrimiento real (leve, moderado, severo) en los informes estadísticos;
- una reflexión sobre la efectividad con la que se aplicaron las tres erres, y sobre si podrían hacerse mejoras en estudios futuros.

Consideraciones previas al estudio

El proceso para asegurar que se reduce al mínimo la severidad durante los procedimientos científicos comienza en la **fase de diseño**, al examinar si es o no necesario, y si está o no justificado utilizar animales para alcanzar los objetivos científicos.

- Cuando es necesario y está justificado el uso de animales, es importante asegurarse de que se elige un modelo apropiado y que el diseño del estudio sea robusto.
- Deberían identificarse todos los aspectos del estudio que puedan causar dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero, y se debería plantear cómo pueden reducirse al mínimo sus efectos, por ejemplo, consultando bibliografía, a otros investigadores, a técnicos, al veterinario y, en su caso, al órgano encargado del bienestar de los animales..
- Se recomienda que la asignación en la clasificación prospectiva de la severidad de los procedimientos esté basada en la severidad más alta prevista para cualquier animal del estudio.
- Debería elaborarse un plan para observar a los animales que sea adecuado para el estudio y adaptado a este. El empleo de una terminología estandarizada que puedan

entender todos los que participan en el estudio mejorará la coherencia de los informes y la interpretación.

- Es importante contar con personal suficientemente capacitado y competente para realizar el estudio y para encargarse del seguimiento y cuidado de los animales.

Indicadores de severidad

Algunos comportamientos y signos clínicos pueden utilizarse para evaluar la severidad de los procedimientos «en el propio alojamiento del animal» (o tanque, corral, etc.). La terminología utilizada para describirlos debe ser comprensible para todas las personas que intervienen en el uso, seguimiento y cuidado de los animales. En todo sistema de evaluación de la severidad es esencial conocer la salud, el comportamiento y el estado de bienestar normales de la especie (o cepa, en su caso) que se observa.

El objetivo debe ser:

- lograr la mejor calidad de vida posible para el animal;
- asegurar que se reconozca cualquier sufrimiento causado por los procedimientos científicos,
- y que este se reduzca al mínimo,

manteniendo la coherencia con los objetivos científicos.

Todos los sistemas de evaluación deben detectar de forma eficaz las desviaciones respecto al estado de salud y bienestar normales y permitir al observador registrar y realizar una evaluación clara y coherente de cada animal.

Para definir un protocolo de evaluación de la severidad sencillo y jerarquizado que se adapte correctamente a la especie, cepa, individuo y procedimiento. El proceso para definir un protocolo de evaluación en el propio alojamiento del animal debería identificar todos los efectos negativos que puedan producirse durante la vida del animal, incluyendo el alojamiento, el sistema de cría y alojamiento, el cuidado y la manipulación, así como los efectos negativos causados por los procedimientos científicos y sus consecuencias. El examen de todos estos efectos negativos debería establecer indicadores que puedan utilizarse para evaluar realmente el bienestar del animal en el propio alojamiento del animal. Estos indicadores deberían adaptarse a la especie, la cepa y los procedimientos experimentales que se apliquen. Asimismo deberían ser fáciles de entender, identificar y registrar de forma coherente. No obstante, es importante asegurar que se puedan reconocer y registrar todos los efectos negativos imprevistos, por ejemplo, en texto libre.

Categorías principales

A continuación se enumera un conjunto de categorías principales aplicables a todas las especies como punto de partida para elaborar una lista exhaustiva de los indicadores específicos para cada procedimiento o programa de cuidado de animales. El propósito es elaborar una lista con los indicadores suficientes para el estudio de que se trate, con el fin de reducir al mínimo el riesgo de pasar por alto signos de sufrimiento, sin que el sistema sea excesivamente complejo y requiera trámites burocráticos innecesarios y mucho tiempo.

Las categorías principales son:

- aspecto;
- funciones corporales;
- entorno;
- comportamientos;
- indicadores específicos del procedimiento;
- observaciones libres (otras observaciones pertinentes).

Los indicadores de cada una de estas categorías pueden adaptarse a cualquier especie. Deberían utilizarse para elaborar una lista de características observables que puedan ser evaluadas por una persona con la formación adecuada para emitir un juicio sobre el estado general de salud y bienestar del animal.

Estos indicadores deberían ser discutidos y seleccionados junto con la persona o personas encargadas de supervisar el bienestar de los animales y, en su caso, el órgano de encargado del bienestar animal. Por lo tanto deberían utilizarse para desarrollar sistemas de recogida de datos específicos para el estudio, a fin de registrar las observaciones, el seguimiento y la evaluación diarios realizados en el propio alojamiento del animal. En el apéndice I se presenta un ejemplo de cómo estas categorías principales pueden subdividirse y utilizarse para elaborar criterios adecuados de observación empleando una terminología descriptiva común.

En el apéndice II se presenta información sobre las directrices y recursos en línea que pueden ayudar a elaborar evaluaciones adecuadas del bienestar de los animales sometidos a procedimientos científicos.

Factores que deben tenerse en cuenta en la evaluación de la severidad real

Es importante señalar que, dependiendo de la situación concreta, varios elementos pueden tener un efecto positivo o negativo en la severidad, y es necesario considerar las diferencias entre especies.

La evaluación de la severidad real debería llevarse a cabo de forma individualizada, caso por caso, utilizando para ello las observaciones del seguimiento diario de los animales. Asimismo, pueden utilizarse otros parámetros necesarios para los fines del estudio cuando sean pertinentes y estén disponibles. Por ejemplo, para el estudio pueden resultar necesarios indicadores no visibles (como la temperatura y el peso corporal, parámetros bioquímicos o datos biotelemétricos, como la frecuencia cardíaca), que deberían tenerse en cuenta en la evaluación de la severidad si pueden brindar información adicional relevante.

La severidad real de la que debe informarse para cada animal debería ser el nivel de severidad más alto experimentado durante el procedimiento y no debería determinarse por la severidad al final de este. La evaluación tampoco debería considerarse un simple proceso sumatorio (por ejemplo, varios procedimientos leves equivalen a una severidad moderada). Esta debería basarse en la evaluación global de lo experimentado por el animal desde el inicio hasta el final del procedimiento.

En la siguiente lista figuran algunos ejemplos del tipo de elementos que deben tomarse en consideración y ponderarse al evaluar la severidad real.

Procedimiento, técnica:

- Quirúrgico, no quirúrgico.
- Nivel y duración del confinamiento.
- La no administración de analgésicos o anestésicos cuando uno de ellos o ambos en otra situación, serían necesarios.
- Modelo o procedimiento nuevo.
- Elementos del entorno (como el alojamiento o restricciones de alimento o agua).
- Estrés o angustia.
- Procedimientos repetidos e intervalos entre éstos (también deben tenerse en cuenta la frecuencia y la combinación de intervenciones «por debajo del umbral»).
- Reutilización o uso continuado.

Especie, cepa, fase de desarrollo, experiencias anteriores:

- **Esta debería ser una consideración importante, pues es necesario comprender la biología y comportamiento de la especie y la cepa (y, en ocasiones, del individuo) para poder predecir y evaluar la severidad de forma eficaz.**
- **Especie y cepa.**
- Origen del animal, por ejemplo, criado para experimentación, asilvestrado o salvaje.
- Proveedor (incluidas las condiciones de alojamiento anteriores) y transporte.
- Genotipo, fenotipo, sexo, edad, estado inmunitario.
- Comportamiento normal y biología (por ejemplo, la importancia relativa de los distintos sentidos, como la vista para los primates y el olfato para los roedores, y la forma en que estos pueden verse afectados en el entorno de un laboratorio).
- Alojamiento individual o en grupo: justificación para aislar animales sociales, o para separarlos de grupos establecidos, a corto o largo plazo.
- Ritmos diurnos, por ejemplo, el impacto de la realización de procedimientos científicos o técnicos en animales nocturnos durante el día.
- Separación de la madre en todas las especies, incluidos los roedores.
- Capacidad cognitiva, consciencia, memoria, percepción de los efectos causados por los procedimientos.

Frecuencia, intensidad:

- No existe un vínculo directo entre la frecuencia y la severidad, es decir, el aumento de la frecuencia no resulta necesariamente en una mayor severidad. Ello se debe a que el efecto que tiene la repetición de los procedimientos o las técnicas en la severidad depende de varios factores, como la intensidad de cada intervención, su duración, la especie y la experiencia del individuo.

- Si se repiten las intervenciones, puede producirse una aclimatación, lo que puede reducir la severidad, por ejemplo, en un primate sometido a procedimientos leves. En cambio, la repetición puede aumentar la severidad, por ejemplo, debido a la anticipación ante un procedimiento estresante o el desarrollo de hiperalgesia si se realiza cirugía.
- Se puede llevar a cabo un entrenamiento con refuerzo positivo o «recompensas» tras los procedimientos.
- Debería registrarse el nivel más alto de severidad y no el «nivel de recuperación».

Duración del efecto:

- La duración está *vinculada* a la intensidad (*y por consiguiente a la severidad*).
- Si es posible, utilizar puntos finales humanitarios o científicos tempranos

Eficacia del refinamiento:

- Analgesia, anestesia y cuidados postoperatorios apropiados.
- Enriquecimiento: tanto enriquecimiento del entorno como alojamiento en grupo para animales sociales.
- Alojamiento, cría y cuidados-tanto si es posible refinarlos de acuerdo con las mejores prácticas actuales, como si el procedimiento requiere restricciones, como confinamiento en recintos de menor tamaño (por ejemplo, jaulas metabólicas), suelos de rejilla o exposición a condiciones medioambientales que puedan causar estrés.
- Entrenamiento del animal para que coopere o facilitar la habituación a los procedimientos.
- Eficacia de los protocolos de evaluación en el propio alojamiento del animal..

Severidad acumulativa:

- En los procedimientos que impliquen varios pasos o intervenciones, deberían tenerse en cuenta lo que experimenta cada animal a lo largo de toda su vida, ya que las limitaciones impuestas a la posibilidad para refinar las condiciones de su alojamiento o la necesidad de capturarlo, manipularlo o confinarlo con frecuencia, etc., pueden influir en la severidad.
- En caso de reutilización, los procedimientos anteriores.
- Es necesario tener en cuenta la experiencia a lo largo de toda la vida, que incluye elementos como el origen (por ejemplo, «destete» anticipado) y el transporte, cuando se considera la reutilización.

Cómo garantizar la coherencia entre la evaluación y la asignación de la severidad real

Generalmente es necesario que científicos, técnicos, veterinarios y el personal encargado de cuidar a los animales realicen aportaciones desde la fase de diseño del estudio para contar con datos que permitan tomar una decisión fundamentada sobre la severidad real al final del procedimiento. La asignación final de una categoría de severidad real será resultado de un análisis de los registros de las observaciones del comportamiento, los signos clínicos y otros parámetros pertinentes realizadas en el propio alojamiento del animal.

Entre los elementos que contribuyen a la coherencia se encuentran:

- la incorporación de diferentes conocimientos técnicos, experiencias y prioridades, es decir, un «enfoque de equipo»;
- la formación en el uso del protocolo de evaluación diaria (incluida la terminología común empleada para describir las observaciones);
- los conocimientos técnicos sobre la salud, el bienestar y el comportamiento de los animales;
- un examen periódico de los resultados;
- la comunicación entre todos los encargados de realizar el estudio y el seguimiento de los animales (descendente, ascendente, entre personas de diferente nivel y personas del mismo nivel);
- la supervisión, a nivel local (por ejemplo, el órgano encargado del bienestar animal), regional, nacional y de la UE.

Los siguientes aspectos clave deberían tenerse en cuenta para garantizar la coherencia de la evaluación de la severidad real:

Elaboración de una hoja de evaluación para cada procedimiento

- Deberían elaborarse hojas de evaluación adaptadas a la especie, cepa y estudio, las cuales deben consensuarse antes del inicio del proyecto.
- Toda la información pertinente disponible debería utilizarse de forma eficaz para elaborar estas hojas de evaluación, por ejemplo, experiencias anteriores, resultados de estudios *in vitro* o *in silico*, búsqueda en la bibliografía, información de estudios piloto y signos clínicos observados en personas u otros animales.
- La información sobre los parámetros que deben observarse y la forma en que debería realizarse el seguimiento deberá estar disponible en el propio alojamiento del animal.
- La clasificación del nivel de severidad prospectiva «dictará» hasta cierto punto, el grado de participación necesario a nivel operativo, si se necesita un enfoque de equipo durante el seguimiento, y qué personas deberían participar en las observaciones y el proceso de registro. Las personas que hayan

elaborado el protocolo de evaluación para el estudio deberían realizar la asignación final de la severidad real o confirmarla.

- Dependiendo de la complejidad del estudio, puede resultar conveniente utilizar hojas de evaluación para cada parte del estudio, por ejemplo, una hoja para cirugía o cuidados postoperatorios, en combinación con una evaluación del protocolo adaptado al estudio.
- En algunos casos, las hojas de evaluación para el estudio deberían incluir también información pertinente para la gestión de colonia, por ejemplo, datos reproductivos y de crecimiento.

Coherencia de la evaluación de la severidad real

La evaluación de la severidad real se lleva a cabo al final del procedimiento y para ello es necesario emitir un juicio sobre la severidad global que realmente ha experimentado el animal, basado en las evaluaciones diarias y teniendo en cuenta los procedimientos realizados.

- Un sistema que se usa habitualmente consiste en definir los niveles «leve», «moderado» y «severo» de cada uno de los indicadores utilizados en las evaluaciones diarias, y luego emitir un juicio acerca de su severidad caso por caso.
- **Al igual que ocurre con el seguimiento diario, es esencial que los criterios de evaluación se adapten al procedimiento, la especie y la cepa;** por ejemplo, una pérdida de peso corporal del 10 % tendrá distintas implicaciones para la salud y el bienestar de una rata joven en crecimiento, de un ratón adulto con un tumor de rápido crecimiento o de un perro adulto.
- Otro factor esencial es tener en cuenta el período en que se producen algunos de estos indicadores, en particular en lo que se refiere a la pérdida de peso y el consumo de alimentos y agua.

La evaluación se efectuará utilizando los registros de las evaluaciones diarias, teniendo en cuenta el procedimiento realizado en el animal, la duración de los efectos adversos y si el animal fue reutilizado. Aunque todo ello implica un cierto grado de subjetividad, la formación de los observadores debería permitir reducirla.

Atribución de la severidad real cuando se encuentra a los animales muertos:

- Si se encuentra a un animal muerto, es decir, si no ha sido eutanasiado, puede ser consecuencia de un procedimiento experimental o de otras causas no relacionadas con este¹.

¹ A efectos de los informes estadísticos, la severidad real debería hacer referencia ante todo a la severidad de los procedimientos experimentales y no a incidentes no relacionados, como brotes de enfermedades o inundación de las jaulas. Estos tipos de incidentes están relacionados con problemas de salud o prácticas de cría y

- La severidad real de los animales encontrados muertos debe consignarse como «severa», a menos que pueda tomarse una decisión fundamentada de que el animal no experimentó un sufrimiento severo antes de morir.
- Si es poco probable que la muerte haya estado precedida por un sufrimiento severo, la clasificación de la severidad real debería reflejar aquella observada antes de la muerte. Es necesario tomar debidamente en consideración factores como la frecuencia del seguimiento, el uso de analgésicos, etc.
- Únicamente los animales vivos pueden experimentar «daño (duradero)».

Deberían elaborarse ejemplos para ilustrar el proceso de clasificación de la severidad, la evaluación diaria y la evaluación de la severidad real final, y ponerlos a disposición de la comunidad científica.

¿Quién debe dar información para la evaluación de la severidad real?

- La observación y el registro de los efectos a menudo son procesos separados de la asignación de la severidad real.
- Deberían establecerse responsabilidades claramente definidas para garantizar el seguimiento diario de los animales, con el apoyo y supervisión adecuados.
- Debería establecerse un proceso de verificación para promover la coherencia, por ejemplo, mediante la comparación de las puntuaciones de evaluaciones hechas por diferentes personas.
- Las funciones de observación y seguimiento de los animales y de elaboración de las evaluaciones de la severidad real deberían ser flexibles y ajustables de acuerdo con la complejidad y la severidad del estudio de que se trate, aunque la responsabilidad legal de detectar y reducir al mínimo el sufrimiento corresponde a la persona designada en la autorización del proyecto.
- Los órganos encargados del bienestar animal también deben desempeñar un papel, en el establecimiento, para garantizar la coherencia.
- Los comités nacionales y las autoridades competentes también pueden contribuir a promover la coherencia.

Herramientas de seguimiento, formas de comunicación y otras consideraciones

- En la fase de planificación del proyecto debería considerarse la posibilidad de utilizar hojas de puntuación.
- Las hojas de puntuación deberían ser lo más sencillas posible, pero tan detalladas como resulte necesario, y adaptadas al tipo de estudio.

mantenimiento y de cuidado de los animales, y no con daños causados por los procedimientos; no obstante, deben registrarse, investigarse y ser objeto de seguimiento para evitar que se repitan.

- Pueden utilizarse hojas de evaluación de proyectos anteriores si son adecuadas para el estudio, la especie y la cepa.
- El registro electrónico de datos puede ayudar a garantizar la coherencia y a facilitar el acceso a toda la información pertinente.
- Se recomienda usar un lenguaje y una terminología normalizados.
- Los datos registrados deben ser lo más objetivos posible.
- Las ventajas y desventajas de i) la puntuación numérica y ii) los sistemas de observación «binarios» (en los que se señala si los indicadores están «presentes» o «ausentes») deberían considerarse caso por caso.
- Cualquier tipo de registro de observaciones deberían permitir añadir texto libre, así como indicadores predeterminados, a fin de poder consignar observaciones imprevistas.
- Es esencial una formación eficaz de todo el personal involucrado, que incluya específicamente la evaluación de la severidad y del bienestar, así como técnicas de seguimiento.
- Debería elaborarse un plan de comunicación que incluya a todo el personal involucrado. Este plan debería incluir un mecanismo para comunicar rápidamente resultados imprevistos a todas las personas adecuadas y, en su caso, a la autoridad competente.
- El seguimiento debería ser proporcional a los efectos previstos, ya que los procedimientos que pueden causar un sufrimiento «severo» requieren un seguimiento más frecuente y pormenorizado.
- Deberían adoptarse criterios de intervención claros, por ejemplo, si se observan determinados parámetros o si se aprecia un nivel predeterminado de sufrimiento. Todo el personal involucrado debería conocer estos criterios, saber qué hacer y a quién dirigirse en caso de que se produzcan.

Si el proceso de evaluación de la severidad se realiza correctamente, los animales y todo el personal encargado de su cuidado y uso se beneficiarán de las mejoras del bienestar de los animales, así como de una mayor validez y transparencia científicas.

Una buena comunicación interna y externa sobre el proceso de evaluación de la severidad y sobre la aplicación de las tres erres permitirá obtener beneficios aún mayores.

Apéndice I

Glosario de observaciones clínicas

El éxito de cualquier programa de evaluación de la severidad depende de la selección de indicadores de bienestar que:

- puedan reconocerse fácilmente y de forma fiable;
- ofrezcan buenos indicadores de bienestar;
- sean pertinentes al estudio científico, la especie y la cepa (en su caso);
- sean prácticos de realizar y no molesten excesivamente al animal; y
- permitan una medición, una interpretación y un análisis coherentes.

Un sistema común para registrar las observaciones es un objetivo deseable, ya que ayudará a elaborar estrategias coherentes para la clasificación de la severidad. De este modo se facilitará la comparación de resultados clínicos entre estudios e informará a las personas encargadas de la evaluación de la severidad.

Las observaciones se estructuran en las siguientes seis categorías de alto nivel:

Aspecto / Funciones corporales / Entorno / Comportamientos / Indicadores específicos del procedimiento / Observaciones

Categorías principales/generales	Aspectos a los que se debe prestar atención al observar animales	Indicadores específicos que deben ser objeto de seguimiento
----------------------------------	--	---

Aspecto	Condición corporal	Pérdida o aumento de peso
		Obeso
	Estado del pelaje y la piel	Delgado
		Escala de condición corporal, si se dispone de ella
		Piloerección
		Descuidado /falta de acicalamiento
		Pelaje engrasado
		Pérdida de pelo
		Deshidratación – manchas en la piel
		Lesiones cutáneas – inflamación, roña, úlceras, lesiones o heridas
		Manchas de heces u orina
		Ocular, nasal, urogenital, manchas de porfirina en algunas especies, por ejemplo, en ratas
	Ojos	Hundidos o apagados
		Cerrados o semicerrados
		Daños o lesiones en los ojos (por ejemplo, úlceras de córnea)
		Salivación
		Maloclusión o dientes excesivamente grandes
	Otros	«Cara de dolor», por ejemplo, ojos semicerrados y abombamiento de la nariz en los ratones
		Constricción del abdomen
		Zonas del cuerpo inflamadas, por ejemplo, abdomen distendido
Funciones corporales	Respiración	Respiración acelerada (taquipnea)
		Respiración forzada (hiperpnea)
		Respiración muy forzada (disnea)
		Jadeo u otro sonido al respirar
	Ingesta de comida o agua Temperatura corporal	Aumento o disminución
		Aumento o disminución; temperatura corporal medida ,si se dispone de ella (por ejemplo, mediante un microchip o dispositivo telemétrico, termometría de contacto o de no contacto), color de las extremidades en los roedores

	Sentidos	Alteraciones de la vista y el oído, y del equilibrio
Entorno	Entorno del recinto, incluyendo lecho, material para anidar, elementos de enriquecimiento	Presencia y consistencia de las heces
		Cama húmeda, por ejemplo, debido a poliuria
		Presencia de vómito o sangre
		Indicar si el animal usa elementos de enriquecimiento, como material para anidar, bloques para masticar
Comportamientos	Interacción social	Cambio con respecto al temperamento normal; interacciones aprensivas o agresivas con otros animales, ansiedad (por ejemplo, respuestas marcadas de huida, ocultamiento)
		Aislamiento o separación respecto de otros animales que forman el grupo social
	Comportamientos indeseados	Comportamiento repetitivo o estereotípico
		Arrancamiento de pelaje (roedores), tricotilomanía
		Agresividad aumentada hacia personas u otros animales
	Postura y movilidad	Postura anormal
		Deambulación anormal, cojera, falta de movimiento/letargia/renuencia a moverse si se le estimula
		Movimientos carentes de coordinación
		Abdomen encorvado, cabeza caída
		Temblores
Otros		Ataques/convulsiones/espasmos
		Vocalización: espontánea o provocada. <i>(Nota: algunas especies, como los roedores, suelen vocalizar mediante ultrasonidos, de modo que las vocalizaciones audibles son de especial interés. Las vocalizaciones de los conejos también son normalmente inaudibles para las personas, a menos que el animal esté angustiado)</i>
		Por ejemplo, en un modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE),
Indicadores específicos del	Se identifican sobre la base del proyecto	

procedimiento	de que se trate, sus posibles efectos adversos y los indicadores previstos de estos	estos indicadores podrían incluir la pérdida de tono en la cola, debilidad de las extremidades traseras o delanteras, parálisis, pérdida de la función de la vejiga urinaria.
Observaciones	Un sistema de evaluación de la severidad siempre debe permitir anotar cualquier observación de efectos negativos imprevistos en el bienestar	

Apéndice II

Fuentes de referencia, guías y recursos en línea sobre la evaluación del bienestar de animales sometidos a procedimientos científicos

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006), *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*, descargable en <http://www.tinyurl.com/65ez5vh>.

Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA), recurso de formación. Véase <http://www.ahwla.org.uk/index.html>.

Canadian Council on Animal Care (CCAC), *Welfare assessment*. Véase <http://www.ccac.ca/>, la sección «Three Rs microsite», y, dentro de esta, búsquese «welfare assessment» (evaluación del bienestar) (en inglés o francés).

Categorising the severity of scientific procedures on animals - Summary and reports from three round-table discussions, edición a cargo de Jane A. Smith y Maggy Jennings en nombre de Boyd Group y la RSPCA, julio de 2004.

Publicado por el Departamento de Animales de Laboratorio de la RSPCA.

FELASA Working Group on the Reporting of Clinical Signs in Laboratory Animals (2012) – (en prensa).

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008), *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press.

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009), *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. Véase http://dels.nas.edu/animal_pain/.

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, *et al.* (2006), Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40**: 323-340.

Joint Working Group on Refinement (2011), A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45**: 1-13.

Leach MC *et al.* (2008), Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17**: 161-170.

National Centre for the Three Rs (NC3Rs), *Welfare assessment*. Véase <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment>.

National Health and Medical Research Council (2008), *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals*. Canberra: Australian Government. Véase <http://www.nhmrc.gov.au>, búsquese «pain and distress» (dolor y angustia).

Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. París: OCDE.

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, *et al.*, Assessing the welfare of genetically altered mice. Versión íntegra disponible en <http://www.nc3rs.org.uk/gamice>. Resumen en *Laboratory Animals* **40**: 111-114.

Workman P *et al.* (2010), Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102**: 1555-1577, descargable en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed>.

1.2. Otras publicaciones de lectura recomendada

<i>Applied Animal Behaviour Science</i>	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
<i>Animal Technology and Welfare</i>	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
<i>Animal Welfare</i>	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
<i>Contemporary Topics in Laboratory Animal Science and Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
<i>Lab Animal y Lab Animal Europe</i>	http://www.labanimal.com/labanimal/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
<i>Laboratory Animals</i>	http://la.rsmjournals.com/

1.3. Palabras clave recomendadas para realizar búsquedas en la bibliografía

Las siguientes palabras clave resultan útiles para buscar información sobre la evaluación de la severidad:

affect (afectar)	harm benefit assessment (evaluación de daños y beneficios)	positive indicators (indicadores positivos)	severity scale (escala de severidad)
animal welfare (bienestar de los animales)	humane endpoints (puntos finales humanitarios)	positive welfare (bienestar positivo)	sickness behavio(u)r (comportamiento de enfermedad)
animal suffering (sufrimiento animal)	needs (necesidades)	qualitative behavio(u)r assessment (evaluación cualitativa del comportamiento)	stress (estrés)
assessment (evaluación)	objective assessment (evaluación objetiva)	quality of life (calidad de vida)	suffering (sufrimiento)
discomfort (malestar)	pain (dolor)	refinement (refinamiento)	welfare assessment (evaluación del bienestar)
distress (angustia)	pain assessment (evaluación del dolor)	score sheets (hojas de puntuación)	welfare indicator (indicador de bienestar)
harm assessment (evaluación del daño)	pain measurement (medición del dolor)	scoring system (sistema de puntuación)	welfare outcomes (resultados de bienestar)

Referencias relativas a la clasificación de la severidad real

CCAC (1998), *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, disponible en: http://www.ccac.ca/en/_standards/guidelines (inglés) y http://www.ccac.ca/fr/_normes/lignes_directrices (francés).

FELASA Working Group on Pain and Distress (1994), Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28**: 97-112.

Jones HRP, Oates J y Trussell BA (1999), An applied approach to the assessment of severity. In: Hendriksen CFM. & Morton DB (eds), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Trabajos de la Conferencia Internacional, 22 a 25 de noviembre de 1998, Zeist, Países Bajos. Royal Society for Medicine Press Ltd., Londres pp. 40-47.

LASA/APC (2008), *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Disponible en: <http://www.lasa.co.uk/publications.html>.

Morton, DB y Hau J (2011), Chapter 18: Welfare assessment and humane endpoints. En *Handbook of Laboratory Animal Science, 3rd Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J y Schapiro, SJ (eds.), CRC Press LLC, Estados Unidos, pp. 535-572.

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J y Thompson P (2004), Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38 Suppl 1**: S1:1-S1:94.

Wolfensohn S y Lloyd M (2003), *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3rd Edition*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (4^a edición en preparación).

(Todos los enlaces se consultaron por última vez el 24 de mayo de 2012).

Ejemplos para ilustrar el proceso de clasificación de la severidad, la evaluación diaria y la evaluación de la severidad real

Bruselas, 11 de enero de 2013

El documento de trabajo *Severity Assessment Framework*² (marco para la evaluación de la severidad), elaborado por el grupo de expertos de la Comisión Europea y apoyado por las autoridades nacionales competentes para la aplicación de la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, en su reunión de julio de 2012, recomendó que se elaboraran ejemplos para ilustrar el proceso de clasificación de la severidad, la evaluación diaria y la evaluación de la severidad real final y que dichos ejemplos se pusieran a disposición de la comunidad científica.

Sobre esta base, el grupo de expertos elaboró una serie de ejemplos para mostrar la forma en que el proceso descrito en el documento de trabajo podía aplicarse a diferentes procedimientos. Estos ejemplos están destinados a ayudar a las autoridades competentes, los usuarios, el personal técnico de animales de laboratorio, los veterinarios y todo el personal participante a predecir, reconocer, mejorar en la medida de lo posible y evaluar de forma coherente el dolor, sufrimiento y angustia durante los procedimientos. El presente documento fue apoyado por las autoridades nacionales competentes para la aplicación de la Directiva 2010/63/UE en su reunión de los días 23 y 24 de enero de 2013.

Al utilizar estos ejemplos es fundamental tener en cuenta una serie de factores importantes:

- Se parte del supuesto de que se **aplican buenas prácticas** en relación al alojamiento, cría y cuidado de los animales; los procedimientos de refinamiento; la educación y formación; la evaluación de la competencia; la obtención y aplicación de la información actualizada sobre reemplazo, reducción y refinamiento; y el diseño del experimento.

²http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Consensus%20doc%20on%20severity%20assessment.pdf.

- El tipo de hojas de puntuación incluidas en los ejemplos tiene por finalidad **complementar** —y no sustituir— **el criterio de un personal formado, competente y empático**. El propósito es permitir una observación, registro y evaluación del sufrimiento que sea más sistemático y objetivo, pero que no reemplacen el criterio profesional.
- Cada ejemplo se refiere a una **situación hipotética, pero realista**. No sería adecuado incluir todos los detalles disponibles en la práctica, pero se indican suficientes detalles **para explicar cómo se aplicó el proceso**.
- Como se señala en el documento de trabajo, es indispensable **concebir y adaptar la evaluación de la severidad** a la especie, la cepa y el procedimiento que se realiza en el establecimiento del usuario. Por ello, el grupo de expertos **recomienda encarecidamente que no se usen** los cuadros y sistemas de hojas de puntuación que figuran en los ejemplos, **ni siquiera para los mismos procedimientos**. La eficacia de todos los protocolos de evaluación de la severidad debe examinarse periódicamente y revisarse en caso necesario.
- Los **ejemplos también son objeto de revisión**, a medida que aumentan los conocimientos sobre los indicadores de dolor, sufrimiento y angustia y cambian los enfoques para evaluar y clasificar la severidad. Cada ejemplo lleva una fecha; consulte el sitio web de la Comisión Europea en http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm para buscar actualizaciones.
- **Agradeceremos la recepción de comentarios** sobre la utilidad de los ejemplos y sugerencias para la inclusión de otros procedimientos; envíe sus observaciones a env-laboratory-animals@ec.europa.eu.

Índice

Modelo 1 – Estudios oncológicos.....	28
<i>Modelo 1a – Mantenimiento de líneas de células de tumores humanos en ratones desnudos inmunológicamente deprimidos.....</i>	<i>29</i>
<i>Modelo 1b – Eficacia de nuevos fármacos en el crecimiento de tumores.....</i>	<i>35</i>
Modelo 2 – Encefalitis autoinmune experimental (EAE) en ratones	42
Modelo 3 – Artritis	52
Modelo 4 – Ictus	63
Modelo 5 – Producción de anticuerpos policlonales en conejos.....	77
Modelo 6 – Producción y mantenimiento de animales modificados genéticamente	84
<i>Modelo – GenA^{tm1a(Funding)Lab}</i>	<i>86</i>
<i>Modelo – Tg(GenB)^{Labcode}</i>	<i>92</i>
<i>Modelo – GenC^{tm1a(Funding)Lab}</i>	<i>94</i>

Ejemplos ilustrativos del proceso de evaluación de la severidad

Modelo 1 – Estudios oncológicos (1a y 1b)

Última actualización: 2 octubre 2014

1. Modelos animales en los estudios oncológicos (1a y 1b)

Contexto general: evaluación de nuevos agentes anticancerígenos *in vivo*

El cáncer es una importante causa de muerte en el mundo desarrollado, y el envejecimiento de la población humana dará lugar inevitablemente a un aumento de esta enfermedad. En 2010, las probabilidades de morir por causas relacionadas con el cáncer en la Unión Europea (UE) antes de cumplir 70 años eran de 1:7. Por ello es necesario desarrollar nuevos fármacos más eficaces para el tratamiento del cáncer, que redundarán en una reducción de la mortalidad por cáncer y una mejor calidad de vida de las personas que desarrollen cáncer en el futuro.

Actualmente se utilizan modelos con animales para desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer, así como modelos informáticos y metodologías *in vitro*, como ensayos con cultivos de células. Una vez que se ha confirmado la selectividad y la actividad de los compuestos *in vitro*, únicamente aquellos compuestos que muestran características favorables se prueban en animales. Se realizan estudios de tolerancia con pequeños grupos de animales para determinar la dosis máxima tolerada y la adecuación de la pauta posológica antes de pasar a estudios de eficacia más amplios.

La severidad de los efectos en los animales dependerá de los modelos y del propósito del estudio. Por ejemplo, el mantenimiento de líneas de células tumorales no debe tener un efecto significativo en el bienestar, siempre que se observen buenas prácticas durante todo el procedimiento, como un seguimiento adecuado de los animales y la adopción de puntos finales humanitarios tempranos. Sin embargo, los estudios realizados para evaluar nuevos tratamientos en modelos metastásicos probablemente presenten mayores problemas para el bienestar debido al desarrollo de múltiples tumores y los posibles efectos adversos de los fármacos citotóxicos.

Se han publicado varias directrices para el uso y el bienestar de los animales en la investigación del cáncer, por ejemplo, en la revista *British Journal of Cancer* (Workman *et al.* 2010). Estas directrices presentan una visión de conjunto de los diversos modelos de tumores en animales existentes, la forma en que afectan a los animales y cómo se puede minimizar su sufrimiento.

En este documento se presentan dos ejemplos que ilustran modelos oncológicos con animales que atienden a distintas clasificaciones de severidad.

Referencia

Workman *et al.* (2010), Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research». *British Journal of Cancer* (2010) 102(11), 1555-1577; descargable gratuitamente en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>.

1a – Mantenimiento de líneas de células de tumores humanos en ratones desnudos inmunológicamente deprimidos

Algunas líneas de células tumorales humanas no se reproducen de forma fiable en cultivos, y en ocasiones es necesario caracterizar y mantener líneas de células humanas en un modelo xenogénico *in vivo*.

Estudio

A 30 ratones desnudos machos BALB/c se les administrará una inyección subcutánea en el costado izquierdo de una suspensión de 10³ células HCT en 0, 1 ml de solución salina . Los animales serán alojados en grupo en cubetas ventiladas individualmente (CVI) con lecho y material para anidar. El bienestar de los animales se evaluará diariamente y los animales se pesarán cada 4 días. Se palpará a los animales en busca de tumores cada 2 días y los tumores detectables se medirán con pie de rey con la misma frecuencia. Los animales se sacrificarán a los 15 días para retirar los tumores.

Evaluación inicial prospectiva y consideración de refinamientos específicos y puntos finales humanitarios

¿Qué acciones lleva a cabo este estudio en los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento podría causar? ¿Qué podría empeorarlo?	¿Cómo se reducirá al mínimo el sufrimiento?
	Efectos adversos	Puntos finales
Mantenimiento de ratones inmunológicamente	Los animales pueden sufrir infecciones.	Alojamiento en CVI y manejo adaptado para minimizar el riesgo de
		Se sacrificará a cualquier animal que muestre signos de enfermedad.

deprimidos		contaminación. Alojamiento en grupo de animales y enriquecimiento del entorno para reducir el estrés. Se revisarán el alojamiento y cuidado si se observan signos de angustia, agresión o comportamiento anormal.	
Inyección subcutánea de células tumorales	Malestar transitorio tras la inyección	Una sola inyección. Se inyectará el volumen adecuado (máximo: 0,2 ml) Los animales serán objeto de un estrecho seguimiento durante el período inmediatamente posterior a la inyección.	Los animales se sacrificarán por métodos incruentos si se observa una angustia o malestar superior a leve sin recuperación rápida después de la inyección (muy pocos casos).
Crecimiento del tumor	Puede causar malestar o afectar al comportamiento o locomoción normales El tumor puede infectarse o ulcerarse (pero no debe dar lugar a metástasis).	El crecimiento de los tumores se medirá cada dos días. El sistema de seguimiento incluirá una observación detallada de la postura, locomoción y tamaño y estado del tumor.	Los animales se sacrificarán si el tumor se ulcera o si interfiere con el comportamiento, la postura o la locomoción normales, o si supera 1,2 cm de diámetro (Workman <i>et al.</i> 2010).

Análisis

Se prevé que los animales experimenten únicamente un malestar **LEVE**, y se sacrificarán si surgen problemas de salud o bienestar por encima de este nivel.

Por consiguiente, resulta adecuada una clasificación prospectiva de la severidad como LEVE.

Al final de este modelo figura un ejemplo de una hoja de observación rellena.

Observaciones clínicas

Se elaboró una hoja de puntuación básica que se concentraba en el tamaño del tumor, el peso corporal, la postura y la locomoción, pues no se preveían muchos otros signos clínicos. Se dejó espacio para registrar signos clínicos imprevistos en forma de texto libre. La indicación de NAD (ninguna anomalía detectada) confirma que se inspeccionó a los animales y que no se observaron anomalías. A continuación se presenta un ejemplo.

Resultados

- No se registró una pérdida significativa de peso en ninguno de los animales.
- En 5 animales no se observó que se desarrollara un tumor.
- En 25 animales se desarrollaron tumores en el costado. Estos tumores no interfirieron con el comportamiento normal, y medían como máximo 1 cm el día 14, cuando se sacrificó a los animales de acuerdo con el protocolo del estudio para extraer los tumores.
- En una cubeta se observó cierto comportamiento agresivo y peleas; un animal tenía heridas de mordeduras en la cola y espalda, se le trasladó a una cubeta individual, las heridas se desinfectaron diariamente hasta su curación y se conservó el animal hasta el final del procedimiento.

Evaluación de la severidad real

- Completaron el estudio un total de 29 animales y solo experimentaron un sufrimiento leve debido a la inyección y el crecimiento de los tumores. Se consideró que la severidad para estos animales fue **LEVE**, y un animal presentaba heridas causadas por mordeduras que se trataron de forma eficaz. Este animal experimentó un sufrimiento mayor debido a la agresión, pero ello no estuvo relacionado con el procedimiento. Estos incidentes se trataron de forma eficaz y el sufrimiento se minimizó. Aunque el nivel de sufrimiento experimentado por este animal fue moderado, se consideró que la severidad real relacionada con el procedimiento fue **LEVE**, ya que este incidente no guardó relación con el procedimiento.

Ejemplo de hoja de observación (rellena para un caso hipotético)

Crecimiento de tumores en ratones desnudos – Hoja de procedimiento y observación					
Cubeta 1 – Ratones nº 1 a 5					
Fecha	Procedimiento	Tamaño del tumor (cm)	Peso (g)	Observaciones clínicas – Comprobar detenidamente la postura y la locomoción	
28/2	Inyección subcutánea		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	No se observan signos de problemas de bienestar tras las inyecciones.	
1/3				Ninguna anomalía detectada (NAD)	

2/3	Palpación				NAD	
3/3					NAD	
4/3	Palpación			1- 21 2- 22 3- 21 4- 22 5- 22	NAD	
5/3					NAD	
6/3	Palpación				NAD	
7/3					Cierto comportamiento agresivo; no se observan heridas.	
8/3	Medición de los tumores	1- 0,1 2- 0,1 3- 0,1 4- sin tumor 5- 0,2		1- 21 2- 22 3- 21 4- 22 5- 22	El ratón 1 tenía heridas causadas por mordeduras en la cola y la espalda: tratamiento local; traslado a una cubeta individual; se proporcionó una caja para nido de un único animal pero se le retiró de la cubeta en la que estaban los otros cuatro ratones por si fuera la causa de la agresión.	
9/3					Desinfección de las heridas del ratón 1, curación satisfactoria; no se observan signos de agresión entre	

				los demás animales.	
10/3	Medición de los tumores	1- 0,2 2- 0,1 3- 0,1 4- sin tumor 5- 0,2		Desinfección de las heridas del ratón 1.	
11/3				Desinfección de las heridas del ratón 1,	
12/3	Medición de los tumores	1- 0,4 2- 0,3 3- 0,3 4- sin tumor 5- 0,5	1- 22 2- 22 3- 21 4- 21 5- 23	Curación de las heridas del ratón 1, suspensión de la desinfección,	
13/3				NAD	
14/3	Sacrificio y extracción de tumores				

1b – Eficacia de nuevos fármacos en el crecimiento de tumores – Procedimiento de varios pasos

El estudio tiene por objetivo evaluar la eficacia de nuevos agentes para reducir o detener el crecimiento de células tumorales. El tumor tiene que estar bien establecido antes de que comience el tratamiento (generalmente basta con un diámetro de 0,5 cm), ya que, debido a la duración del estudio, algunos tumores pueden crecer hasta alcanzar un máximo de 1,2 cm de diámetro, generalmente en el grupo control de vehículo. Los fármacos citotóxicos pueden causar algunos efectos adversos para el bienestar.

Se administrará a 30 ratones desnudos BALB/c una inyección de células tumorales de crecimiento lento (0,1 ml). El bienestar de los animales se evaluará diariamente y los animales se pesarán una vez a la semana durante 3 semanas consecutivas. El crecimiento de los tumores se medirá con un pie de rey los días 7 y 14; los tumores se volverán a medir el día 20, los animales se seleccionarán de forma aleatoria y el tratamiento comenzará en forma de 2 inyecciones intraperitoneales diarias durante 7 días.

Evaluación inicial prospectiva y consideración de refinamientos específicos y puntos finales humanitarios

¿Qué acciones lleva a cabo este estudio en los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento podría causar? ¿Qué podría empeorarlo?	¿Cómo se reducirá al mínimo el sufrimiento?
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones
Mantenimiento de ratones inmunológicamente deprimidos	Los animales pueden sufrir infecciones.	Alojamiento en CVI y manejo adaptados para minimizar el riesgo de contaminación. Alojamiento del grupo de animales y enriquecimiento del entorno para reducir el estrés. Se revisarán las prácticas de alojamiento y
		Puntos finales
		Se sacrificará a cualquier animal que muestre signos de enfermedad intercurrentes.

			cuidado si se observan signos de angustia, agresión o comportamiento anormal.		
Inyección subcutánea de células tumorales	Malestar pasajero tras la inyección.	Malestar pasajero tras la inyección. Se inyectará el volumen adecuado (máximo: 0,2 ml). Los animales serán objeto de un estrecho seguimiento durante el período inmediatamente posterior a la inyección.	Una sola inyección.	Los animales se sacrificarán por métodos incruentos si se observa una angustia o malestar superior a leve cuando no haya una recuperación rápida después de la inyección (muy pocos casos).	
Crecimiento del tumor	Puede causar malestar o afectar al comportamiento o locomoción normales El tumor utilizado puede infectarse o ulcerarse (pero no debe dar lugar a metástasis).	Observación diaria de los animales, seguimiento periódico de la salud general y crecimiento del tumor El sistema de seguimiento incluirá una observación detallada de la postura, locomoción y tamaño y estado del tumor. Los tratamientos con fármacos comenzarán cuando el tumor alcance un diámetro de 0,5 cm (medido con un pie de rey).	Observación diaria de los animales, seguimiento periódico de la salud general y crecimiento del tumor El sistema de seguimiento incluirá una observación detallada de la postura, locomoción y tamaño y estado del tumor. Los tratamientos con fármacos comenzarán cuando el tumor alcance un diámetro de 0,5 cm (medido con un pie de rey).	Los animales se sacrificarán si el tumor se ulcera o si interfiere con el comportamiento, la postura o la locomoción normales, o si supera 1,2 cm de diámetro (Workman <i>et al.</i> 2010).	
Inyección intraperitoneal de un nuevo fármaco	Malestar pasajero tras la inyección Los fármacos citotóxicos pueden causar diarrea, pérdida de peso,	Los animales serán objeto de un estrecho seguimiento durante el período inmediatamente posterior a la inyección. Volumen máximo diario de 10 ml/kg	Los animales serán objeto de un estrecho seguimiento durante el período inmediatamente posterior a la inyección. Volumen máximo diario de 10 ml/kg	Se sacrificará a los animales que pierdan más del 20 % de su peso corporal inicial. Se sacrificará a los animales que no coman o que tengan	

	anorexia o letargia.	durante 7 días. Se utilizarán las dosis mínimas (determinadas mediante estudios de dosificación). Se utilizará un sistema de puntuación clínica para evaluar el bienestar.	diarrea durante más de 48 horas Se establecerá como punto final humanitario un límite superior de puntuación clínica.
--	----------------------	--	--

Análisis

Como consecuencia del tamaño del tumor, la creciente posibilidad de ulceración, la frecuencia de las inyecciones y los efectos adversos de los fármacos administrados, en este caso resulta adecuada una **clasificación prospectiva de la severidad MODERADA**.

¿Podría establecerse el límite de severidad en LEVE?

Es muy poco probable, a menos que los objetivos científicos puedan alcanzarse con puntos finales más tempranos, por ejemplo, si se reduce el tamaño máximo del tumor. Ello implicaría inyectar fármacos a dosis que se sabe no causan efectos clínicos adversos importantes. En estas circunstancias, podría considerarse adecuada una severidad **LEVE**.

Observaciones clínicas

Al final de este modelo figura un ejemplo de hoja de observación y una muestra de hoja de puntuación.

Resultados

De los 30 ratones machos BALB/c, 25 se utilizaron para evaluar la eficacia; 10 animales recibieron una dosis H del fármaco B, 10 recibieron una dosis X del fármaco B, y 5 recibieron una dosis Y del fármaco C.

Evaluación de la severidad real

- Tres animales no desarrollaron tumores y fueron sacrificados al no poder ser utilizados para el experimento – **LEVE**.
- Dos animales desarrollaron ulceración en el lugar de la inyección de células tumorales antes de iniciar el tratamiento y fueron sacrificados – **MODERADA**.
- Diez animales que recibieron una dosis H del fármaco B desarrollaron tumores de tamaño relativamente pequeño, sin pérdida significativa de peso corporal ni signos clínicos – **LEVE**.
- Siete animales que recibieron una dosis X del fármaco B experimentaron una reducción del tamaño del tumor, una pérdida de peso corporal del 15 % y heces sueltas, pero se mantuvieron hasta el final del experimento – **MODERADA**.
- Tres animales que recibieron una dosis X del fármaco B experimentaron una reducción del tamaño del tumor, una pérdida de peso corporal del 15 %, heces sueltas, anorexia y una gran letargia, y fueron sacrificados de modo incruento en el día 25 – **SEVERA**.
- En cinco animales que recibieron una dosis Y del fármaco C, el tamaño del tumor continuó creciendo, el peso corporal aumentó y no se observaron otros signos clínicos aparte del crecimiento del tumor. Estos animales se sacrificaron cuando el tamaño del tumor superó 1,2 cm – **MODERADA**.

Ejemplo de hoja de puntuación

Nº de animal				
Fecha	1/6	2/6	3/6	4/6
Aspecto				
Peso corporal				
Estado del pelaje				
Funciones corporales				
Disnea o taquipnea				

Ingesta de alimentos							
Entorno							
Heces sueltas o diarrea							
Sangre en la diarrea							
Comportamientos							
Manipulación							
Agresión							
Locomoción anormal							
Postura anormal							
Resistencia a moverse							
Indicadores específicos del procedimiento							
Tamaño del tumor							
Ulceración del tumor							
El tumor impide el movimiento							
Puntuación total							
Otras observaciones							

--	--	--	--	--

Ejemplos de puntuaciones clínicas

Aspecto	Puntuación
Peso corporal	
Pérdida de peso del 5 % al 10 %	1
Pérdida de peso del 11 % al 15 %	2
Pérdida de peso del 16 % al 20 %	3
Pérdida de peso superior al 20 %	PFH
Estado del pelaje	
Pelaje ligeramente descuidado	1
Piloerección leve	2
Piloerección marcada	3
Funciones corporales	
Taquipnea (respiración rápida)	1
Disnea (dificultad para respirar)	3
Entorno	

Acciones	
Puntuación 1	Revisar la frecuencia del seguimiento
2	Considerar la posibilidad de administrar cuidados suplementarios, por ejemplo, líquidos adicionales
4	Consultar a un veterinario
6	Adoptar un punto final humanitario

Heces sueltas o diarrea	1	
Sangre en la diarrea	PFH	
Comportamiento		
Tenso y nervioso durante la manipulación	1	
Muy angustiado durante la manipulación, por ejemplo, con temblores, vocalización, agresividad	3	
Locomoción		
Postura/locomoción ligeramente anormales	1	
Postura/locomoción muy anormales	2	
Grandes problemas de movilidad/resistencia a moverse	3	
Inmovilidad durante más de 24 horas	PFH	
Indicadores específicos del procedimiento		
Tamaño del tumor superior a 1,2 cm	PFH	
Ulceración del tumor	PFH	
El tumor impide el movimiento	PFH	

Ejemplos ilustrativos del proceso de evaluación de la severidad

Modelo 2– Encefalitis autoinmune experimental (EAE) en ratones

Última actualización: 2 octubre 2014

Contexto general

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) se utiliza para elaborar modelos de diversos aspectos de la esclerosis múltiple en roedores y primates. La esclerosis múltiple es un trastorno neurológico complejo que adopta muchas formas y afecta a los adultos jóvenes. Entre sus efectos se encuentran la inflamación, la desmielinización y la pérdida de axones. Se utilizan modelos con animales para investigar la fisiopatología de esta enfermedad y para evaluar posibles estrategias de protección o curación, como la inmunomodulación, la regeneración de axones y la reparación de la mielina. Las características multifásicas y multiformes de la esclerosis múltiple hacen que sea necesario utilizar modelos adecuados para responder a preguntas concretas sobre las diferentes fases de la enfermedad.

La EAE implica generar una actividad del sistema inmune dirigida contra la mielina, lo que produce inflamación en el sistema nervioso central y la apertura de la barrera hematoencefálica, lo que a su vez puede causar un grave síndrome neurológico en el modelo animal, que debe ir seguido de una recuperación parcial durante la primera fase crónica remitente - recidivante. Esta fase está asociada a inflamación y desmielinización reversible. Transcurridas entre 9 y 10 semanas, el animal entrará en la forma progresiva, que está asociada con la desmielinización crónica y la pérdida de axones. Durante esta fase es posible evaluar diversas estrategias terapéuticas. Deben elegirse cuidadosamente puntos finales humanitarios y científicos teniendo en cuenta los objetivos del estudio.

Referencias

- Emerson MR *et al.* (2009), Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine*. **59**: 112-128.
- Miller SD *et al.* (2010), Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology*. **88**: 15.1.1-15.1.20.

Weissert R (ed) (2012), *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - Models, Disease Biology and Experimental Therapy*. Publicado por In Tech, DOI: 10.5772/1190, <http://www.intechopen.com>.

Wolfensohn S *et al.* (en preparación), *Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*.

Estudio

En este ejemplo se provocará EAE en cuatro ratones machos y cuatro ratones hembras Biozzi ABH (una cepa utilizada ampliamente que se considera que tiene un gran valor translacional) a fin de evaluar una posible terapia para la esclerosis múltiple. En la fase de planificación inicial del proyecto, el usuario examina cada posible efecto adverso para los animales e identifica las posibles causas de sufrimiento en colaboración con el técnico, el personal encargado del cuidado de los animales y el veterinario a cargo. Estos buscan refinamientos y los aplican en el proyecto. Los ratones se alojarán en grupos de cuatro del mismo sexo. Se prestará especial atención al entorno local, ya que los animales con EAE tendrán importantes deficiencias motoras. Las cajas tendrán suelo sólido, lecho de viruta libre de polvo, refugios adecuados y material para anidar así como bloques para roer. Los animales serán tratados con un adyuvante inflamatorio para provocar EAE y serán objeto de seguimiento durante la recuperación y la fase crónica remitente - recidivante (de nueve a diez semanas). Una vez que se haya desarrollado la forma progresiva, se evaluarán los compuestos terapéuticos candidatos en los ratones en el marco de un estudio de tres semanas de duración.

Evaluación inicial prospectiva y consideración de refinamientos específicos y puntos finales humanitarios

¿Qué acciones lleva a cabo este estudio en los	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento podría causar?	¿Cómo se reducirá al mínimo el sufrimiento?
--	---	---

animales?	¿Qué podría empeorarlo?		
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones	Puntos finales
Múltiples inyecciones de adyuvante inflamatorio	Malestar o dolor debido a las primeras inyecciones. Posible reacción en el lugar de la inyección, causando irritación o malestar.	Se inyectarán pequeñas dosis en distintos puntos subcutáneos (no en la zona plantar ni la base de la cola). El adyuvante y el vehículo se han formulado de tal modo que apenas tienen efectos irritantes tras la inyección. Los animales serán objeto de seguimiento después de la inyección.	Los animales se sacrificarán por métodos incruentos si se observa un dolor o angustia pasajeros que superen el nivel moderado tras la inyección.
Inducción de EAE – síndrome neurológico severo seguido de una fase de recuperación	Parálisis, que puede causar angustia o ansiedad: pérdida de tono en la cola, debilidad de las extremidades posteriores, hipomotilidad, parálisis de las extremidades, disfunción urinaria (incontinencia o retención)	Se hará un seguimiento de la función urinaria mediante control diario de la vejiga. Se presionará manualmente la vejiga de ser necesario en caso de retención (se hará un seguimiento metódico de los signos de dolor o angustia tras vaciar la vejiga). Si los animales sufren incontinencia, se controlará frecuentemente la cubeta para ver si el lecho o el material para anidar está mojado; de ser necesario, se reemplazará por material seco Habrá refugios y material para anidar	PFH si se cumple cualquiera de los siguientes criterios: • Parálisis bilateral de las extremidades anteriores durante más de 24 horas. • Parálisis bilateral de las extremidades posteriores durante un máximo de 5 días. • Cualquier automutilación. • Retención persistente de orina/Incapacidad para vaciar la vejiga. • Paresia (pérdida de movimiento, parálisis ligera). • Pérdida de peso del 35 %*.

			adecuados.	• Dejar de comer o beber durante más de 24 horas tras el inicio de la enfermedad. • No recuperación de la EAE • 3 semanas después del inicio de la enfermedad clínica. • Signos clínicos de enfermedad intercurrente, por ejemplo, cifosis de espalda.
	Pérdida importante de peso (por ejemplo, hasta un 35 %)		Se garantizará el acceso constante a agua y alimentos colocados en recipientes en el suelo de la cubeta El peso y el estado corporal serán objeto de seguimiento diario y se puntuarán con más frecuencia (de ser necesario) cuando empiece la pérdida de peso. Se suministrarán alimentos húmedos y fluidos solidificados, con suplementación subcutánea de ser necesario.	
Curso clínico de remisión y recaída	Deficiencias neurológicas crónicas		Se reducirán todos los agentes estresantes, incluido el ruido. La temperatura ambiente se aumentará de ser necesario, con almohadillas térmicas, lecho y material adicional para anidar.	

Administración de un nuevo agente terapéutico (durante la forma progresiva)	Malestar debido a la inyección Efectos secundarios o falta de eficacia del agente	Los animales serán objeto de un estrecho seguimiento tras la inyección del agente terapéutico propuesto.	Los animales se sacrificarán por métodos incruentos si se observa cualquiera de los indicadores antes mencionados, o si el nuevo agente terapéutico produce efectos secundarios severos.
---	--	--	--

* La pérdida de peso del 35 % es un punto final extremo que exige una justificación científica sólida. En este caso, una pérdida de peso importante resulta inevitable y los animales pueden recuperarse con la ayuda adecuada, por ejemplo, calor y alimentación adicionales, incluida la alimentación manual de ser necesario. En este estudio se establece un punto final del 35 %, con el fin de reducir la necesidad de inducir EAE en un mayor número de animales no sometidos a tratamiento, número que sería significativamente mayor con un punto final más «convencional» (por ejemplo, un 20 %).

Análisis

Se considera adecuada una clasificación prospectiva como SEVERA, ya que se prevé que el procedimiento tenga consecuencias graves para el bienestar general y el estado de los animales.

¿Podría ser la clasificación MODERADA?

Aunque la severidad prospectiva de este modelo siempre debe ser SEVERA por las razones antes indicadas, la clasificación retrospectiva de la severidad puede ser MODERADA en función de la duración del estudio y la aplicación de PFH tempranos, como se indica aquí.

Observaciones clínicas

Durante el estudio, los ratones fueron objeto de seguimiento por parte del personal técnico de animales de laboratorio y el personal encargado de su cuidado mediante un sistema de hojas de puntuación clínica adaptadas al protocolo, previa consulta a los usuarios, el personal técnico de animales de laboratorio, el personal encargado del cuidado de los animales y el veterinario. Estas hojas incluían parámetros relativos al peso, el estado del pelaje, tono

de la cola, control de la vejiga, grado de incorporación, locomoción, paresia y signos avanzados (posición de descanso sobre el costado, parálisis casi completa, respiración rápida, lenta o profunda). Puesto que el proyecto implicaba la realización de procedimientos severos, los animales fueron objeto de un seguimiento muy detallado, y el usuario realizó exámenes continuos de la severidad, tras consultar al órgano de control del bienestar animal, al personal técnico de animales de laboratorio y al veterinario designado. A continuación se presenta un ejemplo ilustrativo de una hoja de puntuación.

Ejemplo de una hoja de puntuación adecuada

Cuadro. Hoja de puntuación clínica utilizada para ratones con EAE

Fecha:							
Aspecto							
Peso corporal							
Estado del pelaje							
Funciones corporales							
Control de la vejiga							
Tono de la cola							
Respiración							
Entorno							
Estado del nido							
Comportamiento							
Comportamiento social							

Locomoción						
Indicadores específicos del procedimiento						
Posición de reposo sobre el costado						
Tiempo para incorporarse						
Paresia						
Parálisis						
Otras observaciones						
(Texto libre)						

Notas: Cada indicador se evaluó con el sistema indicado en el cuadro que figura a continuación, en el que (por ejemplo) se indica «1» junto a «tono de la cola» si se observa que el animal la levanta menos, y «2» junto a «estado del nido» si este está desorganizado.

Cuadro. Sistema de evaluación de los indicadores en la hoja de puntuación clínica de EAE

Puntuación:	1 = Leve	2 = Moderado	3 = Severo
Pérdida de peso	Hasta el 10 %	Del 10 % al 20 %	Del 20 % al 35 %

Estado del pelaje	Ligeramente descuidado	Falta de acicalado	Piloerección marcada o prolongada
Control de la vejiga - incontinencia	Indicios de pérdida de control, por ejemplo, pequeñas cantidades de orina en el nido	«Fugas» de orina más pronunciadas	Incontinencia
Control de la vejiga - retención	La vejiga puede palparse, pero se vacía durante la manipulación	Se requiere algo más de esfuerzo para vaciar la vejiga	Incapacidad para orinar sin asistencia, signos de malestar/angustia durante o después del vaciado manual
Tono de la cola	Disminución del levantamiento o enroscado de la cola	Pérdida de tono en la mitad distal de la cola	Pérdida de tono en toda la cola
Respiración: rápida, lenta o profunda	Ligera	Moderada	Markada
Estado del nido	Ligeramente desorganizado	Se ha intentado construir un nido, pero este está desorganizado	No existe un nido
Comportamiento social	Sin cambio previsto con sufrimiento leve, la puntuación comienza en 2	Interacción reducida con otros animales	Interacción sumamente reducida, pasividad
Locomoción	Torpe	Arrastra una extremidad posterior	Arrastra ambas extremidades posteriores
Posición de reposo sobre el costado	Sin cambio previsto con sufrimiento leve o moderado, la puntuación comienza en 3	Sin cambio previsto con sufrimiento leve o moderado, la puntuación comienza en 3	Presente
Tiempo para incorporarse	Lentitud para incorporarse al estar	Grandes dificultades para	Incapacidad para incorporarse 5 segundos después de estar de

	de espaldas	incorporarse	espaldas
Paresia	Abducción lenta de las extremidades anteriores al estar de espaldas	Alcance reducido de la abducción de las extremidades anteriores al estar de espaldas	Sin abducción de las extremidades anteriores
Parálisis casi completa o completa	Sin cambio previsto con sufrimiento leve o moderado, la puntuación comienza en 3	Sin cambio previsto con sufrimiento leve o moderado, la puntuación comienza en 3	Presente

Evaluación de la severidad real

Al final del procedimiento se examinó la hoja de puntuación de cada individuo para ver la puntuación de cada indicador y su evolución en el tiempo.

- Dos ratones perdieron un 8 % de su peso corporal tras la inducción de la EAE, tenían el pelaje ligeramente descuidado y presentaban una abducción lenta de las extremidades anteriores, pero obtuvieron una puntuación de «2» en todos los demás indicadores durante los primeros 5 días del proyecto. Sus puntuaciones pasaron posteriormente a «1» ó «0» en cada indicador durante la fase de recaída y remisión, y durante el ensayo del fármaco. Clasificación = **MODERADA**.
- Tres ratones perdieron entre un 22 % y un 32 % de su peso corporal y obtuvieron una puntuación de «3», «2» y «1» durante toda la fase de recaída y remisión, y durante el ensayo del fármaco. Clasificación = **SEVERA**.
- Un ratón perdió un 37 % de su peso corporal durante la fase posterior a la inducción de EAE y fue sacrificado de modo incruento. Clasificación = **SEVERA**.
- Dos ratones perdieron el 15 % y el 18 % de su peso corporal, respectivamente, y obtuvieron una puntuación de «2» y «3» en todos los demás indicadores durante los primeros 4 días del estudio. A continuación obtuvo una puntuación de «1» y «2» durante toda la fase de recaída y remisión, y durante el ensayo del fármaco. Clasificación = **SEVERA**.

No se observó parálisis y resultó demasiado difícil evaluar la respiración al lado de la cubeta, por lo que estos dos parámetros se eliminaron de las hojas de registro. En las casillas para texto libre a menudo se indicó que los animales pasaban un mayor tiempo en los refugios, lo que se consideró un indicador temprano de sufrimiento, y se añadió a las hojas de puntuación para futuros proyectos.

La clasificación de 6 animales se consideró **SEVERA** y la de 2 animales **MODERADA**.

Oportunidades para aplicar el reemplazo, la reducción y el refinamiento en el futuro

Tras evaluar la severidad real, los usuarios consultaron a otros usuarios y buscaron otros refinamientos en la bibliografía. Se identificaron los siguientes refinamientos adicionales:

- Alimentar previamente a los animales con alimentos complementarios ricos en energía, como gelatina y leche condensada, antes de administrar el adyuvante.
- Usar una menor dosis de adyuvante.
- Usar otro protocolo para el estudio a fin de reducir la duración del proyecto.

Estos refinamientos se añadieron al protocolo para futuros estudios con la intención de comparar los niveles de severidad real para comprobar si los refinamientos habían resultado eficaces.

Ejemplos ilustrativos del proceso de evaluación de la severidad

Modelo 3 – Artritis

Última actualización: 02 octubre 2014

Contexto general

Los modelos de artritis con animales se utilizan para estudiar la patogénesis de esta enfermedad y para evaluar posibles fármacos contra ella para uso clínico. Por consiguiente, entre los criterios importantes para la selección del modelo se encuentran las similitudes morfológicas con la enfermedad humana y la capacidad del modelo para predecir la eficacia de los compuestos terapéuticos candidatos en humanos.

Entre los modelos con animales más usados para el estudio de la artritis reumatoide se encuentran: la artritis inducida por adyuvante en ratas, la artritis inducida por colágeno de tipo II en ratas, la artritis inducida por colágeno tipo II en ratones y la artritis inducida por antígenos en varias especies (Bendele, 2001). Generalmente se utiliza una inyección en la base de la cola, ya que ofrece una buena respuesta inmunogénica, si bien en la bibliografía se señalan también otros puntos para esta inyección. Asimismo existen variaciones considerables en las cepas en lo que respecta a la susceptibilidad, la severidad y la latencia al inicio de la artritis. Por ejemplo, la susceptibilidad de las líneas modificadas genéticamente para desarrollar artritis puede modificarse (aumentar o suprimir) en función de los efectos de las alteraciones de los genes. En modelos con animales para el estudio de la artritis más comúnmente utilizados y que, por ende, han sido validados, el inicio de la enfermedad es predecible, y las técnicas de evaluación suelen estar bien definidas y caracterizadas. En estos modelos pueden emplearse múltiples evaluaciones, incluido el análisis de la locomoción y el uso de filamentos de Von Frey, por oposición a medidas individuales de observación.

Cabe señalar que es necesario examinar periódicamente las cepas, los protocolos y los refinamientos existentes a fin de seleccionar caso por caso el o los más adecuados para responder a la pregunta científica que se formula (Joe *et al.*, 1999).

El modelo que se presenta en este ejemplo es el de artritis inducida por colágeno de tipo II en ratas, que puede causar un sufrimiento severo. Por ello, un requisito absoluto para usarlo es contar con una justificación científica convincente. Las ratas se inmunizan contra el colágeno de tipo II heterólogo mediante lesiones similares a las que se observan en la artritis reumatoide humana (Bendele, 2001). La poliartritis resultante se caracteriza por una amplia destrucción de cartílago asociada con deposición compleja inmune en las superficies de las articulaciones, reabsorción de hueso y proliferación del perostio, así como sinovitis moderada a grave e inflamación periarticular.

Referencias

- Bendele, A.M., Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4):377-385.
- Jasemian Y. *et al.* (2011), Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* 1(4): 469-477.
- Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L., Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999; 1 139-149.

Estudio

En este ejemplo se inducirá artritis en 36 ratas Lewis, 18 machos y 18 hembras, mediante inyecciones repetidas de FIA (adyuvante incompleto de Freund) y colágeno. Las inyecciones se realizarán en la base de la cola. El tratamiento diario comenzará 10 días después (D10), cuando se haya desarrollado la artritis, y luego continuará diariamente durante otros 14 días (hasta D24). El objetivo del estudio es poner a prueba agentes terapéuticos putativos. Se consultaron datos publicados con anterioridad sobre compuestos relacionados para ver si la administración de analgésicos interferiría con los objetos científicos, y se determinó que introduciría confusión en el experimento. Por ello no se administrarán analgésicos durante el desarrollo de la artritis ni al grupo de control, y se prestará especial atención a los métodos no farmacológicos para aliviar el dolor (por ejemplo, requisitos de prácticas zootécnicas) a fin de reducir el sufrimiento.

Se observará y se pesará diariamente a todos los animales, y se registrará una puntuación en la hoja general de puntuación clínica, y se evaluarán el día 0 (D0; antes de la primera inyección) y los días D10 (antes del inicio del tratamiento), D13, D16, D20 y D24. Las pruebas incluirán la medición indirecta de alteraciones físicas, como el diámetro de las articulaciones (realizada mediante un pie de rey) y la puntuación clínica con arreglo a un sistema de puntuación para la artritis. Se aplicarán puntos finales humanitarios en función de las puntuaciones clínicas (véase más abajo).

Evaluación de nuevos agentes farmacéuticos terapéuticos en un modelo de artritis en ratas (colágeno de tipo II)

Clasificación SEVERA

¿Qué acciones lleva a cabo este estudio en los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento podría causar? ¿Qué podría empeorarlo?	¿Cómo se reducirá al mínimo el sufrimiento?		
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones	Puntos finales	
Inyecciones subcutáneas de colágeno bovino tipo II en adyuvante incompleto de Freund (FIA) en la base de la cola hasta en tres ocasiones	Estrés de confinamiento. Dolor pasajero, inflamación moderada en el lugar de la inyección y malestar durante uno o dos días. Posibilidad de ulceración de la piel, aunque poco probable con FIA.	Actitudes empáticas y manipulación competente durante todos los procedimientos. Selección de dosis y fórmulas normalizadas para minimizar la inflamación y el dolor	Si la ulceración de la piel persiste o se infecta, los animales se sacrificarán de modo incruento.	
Desarrollo de la artritis (D0 a D10)	Malestar, dolor, discapacidad y angustia; el animal puede mostrar signos de enfermedad, por ejemplo, aspecto apagado, falta de	Seguimiento clínico detallado utilizando una hoja general de puntuación clínica, con aumento de la frecuencia del seguimiento al inicio de los signos	Los animales se sacrificarán de modo incruento si alcanzan las puntuaciones clínicas determinadas previamente	

	apetito, resistencia a moverse, pérdida de peso, inflamación de las articulaciones, vocalización audible durante la manipulación.	clínicos (normalmente entre el D8 y el D10). Durante todo el estudio se suministrará lecho suave adicional y material para anidar . Fácil acceso al agua y los alimentos (por ejemplo, en el suelo de la cubeta) durante todo el estudio. Se utilizará un sistema de puntuación clínica que evalúe el grado de inflamación y el número de articulaciones afectadas.	para los puntos finales humanitarios (véase el cuadro más abajo).
Administración de fármacos (grupos de prueba y control, dos veces al día) por vía subcutánea o intraperitoneal (D10 a D24)	Malestar pasajero tras la inyección. No se prevé que los fármacos tengan efectos adversos, de acuerdo con datos anteriores obtenidos con animales.	Seguimiento clínico detallado y diario utilizando una hoja general de puntuación clínica.	Se aplicarán puntos finales humanitarios si se producen efectos adversos significativos.
Evaluación de los efectos de los fármacos en la severidad de la artritis (D0, D10, D13, D16, D20 y D24)	Dependiendo de los métodos utilizados, puede producirse dolor o malestar adicional pasajero, por ejemplo, uso de filamentos de Von Frey, uso del pie de rey, necesidades de manipulación.	Seguimiento clínico detallado. Reducción de la frecuencia del seguimiento (al mínimo necesario para alcanzar los objetivos científicos) hasta que los animales se recuperen.	Véase el cuadro más abajo

Nota

El investigador, el veterinario, el personal técnico de animales de laboratorio y el personal encargado del cuidado de los animales discutirán sobre un sistema de puntuación clínica y de artritis, y lo aprobarán antes del comienzo del estudio.

Análisis

Debido a la posibilidad de que el estudio tenga un efecto clínico significativo en los animales, que puede prolongarse varias semanas, se considera adecuada una clasificación **SEVERA**.

¿Podría ser la clasificación MODERADA?

La posibilidad de reducir la clasificación a moderada depende del propósito del estudio. Por ejemplo, con un seguimiento frecuente y detallado de los animales y cuando existe la posibilidad de aplicar puntos finales tempranos (así, al iniciarse la cojera o después de un período de leve cojera en una extremidad, o si se usan métodos de diagnóstico de imágenes *in vivo* para detectar los primeros cambios en la patología de las articulaciones), el procedimiento podría clasificarse como MODERADO. Estos puntos finales tempranos (por ejemplo, finalizar el estudio el sexto día después del diagnóstico de imágenes) son posibles en proyectos que investigan los primeros cambios inflamatorios. El tratamiento profiláctico (antes del pleno desarrollo de la artritis) con nuevos fármacos que tengan potentes efectos antiinflamatorios y limiten el desarrollo de la artritis también puede reducir la clasificación a **MODERADA**. Sin embargo, el tipo de estudio que ilustramos aquí pretende evaluar los tratamientos para la artritis plenamente desarrollada, de modo que la clasificación sigue siendo **SEVERA**.

¿Podría la severidad exceder el límite superior?

Con arreglo al artículo 15, apartado 2, de la Directiva, «los Estados miembros velarán por que no se realice un procedimiento si implica dolor severo, sufrimiento o angustia que pueda ser duradero y que no pueda experimentar una mejora». Este estudio puede causar sufrimiento severo durante varias semanas, y debe considerarse de larga duración. Si los animales desarrollaran una artritis severa en las cuatro extremidades y no se redujera su sufrimiento,

el estudio excedería el límite superior de severidad y sería necesario refinarlo de forma significativa o invocar la «cláusula de salvaguardia» (artículo 55 de la Directiva) y solicitar autorización a la Comisión.

No obstante, en este ejemplo se han adoptado medidas para reducir el sufrimiento —teniendo en cuenta al mismo tiempo los objetivos científicos—, como el refinamiento de la composición, vía de administración y elección del coadyuvante, permitiendo únicamente que la artritis se desarrolle en las extremidades posteriores y brindando un entorno cómodo y de fácil acceso a los alimentos y el agua, un sistema exhaustivo de seguimiento y puntos finales humanitarios. Así pues, no se consideraría que este proyecto excede el límite superior, y puede autorizarse mediante una evaluación positiva del proyecto que incluya el examen de los daños y los beneficios.

A continuación se presenta un ejemplo de hoja de puntuación clínica para la observación diaria de ratas con artritis

Fecha:	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Aspecto				
Peso corporal				
Falta de acicalado				
Deshidratación				
Funciones corporales				
Disnea				

Taquipnea					
Comportamiento					
Resistencia a moverse					
Letargia/apatía					
Inmovilidad					
Vocalización					
Indicador específico del procedimiento					
Puntuación de la extremidad artrítica (véase el cuadro 2)					
Otras observaciones					
(Texto libre)					
Puntuación total					

Nota: Cada indicador se evaluó mediante el sistema que se recoge en los cuadros 1 y 2 que figuran a continuación. Por ejemplo, en la hoja de puntuación, junto a «falta de acicalado» (cuadro 1) se introduciría «1» y junto a «indicador específico del procedimiento» se introduciría «5», si las dos extremidades posteriores obtuvieran una puntuación de «3» y «2», respectivamente (cuadro 2). Las acciones y los puntos finales que figuran más abajo tienen en cuenta la necesidad de evitar un sufrimiento severo cuando sea posible, pero no de sacrificar de modo humanitario a los animales antes de haber obtenido suficientes datos, lo que haría necesario utilizar otros animales no sometidos a experimentos.

Cuadro 1. Sistema de puntuación para los indicadores utilizados en la hoja de puntuación clínica

<u>Aspecto</u>	Puntuación
Normal, pérdida de peso inferior al 5 %	0
Pérdida de peso del 5 % al 10 %	1
Pérdida de peso del 11 % al 15 %	2
Pérdida de peso del 16 % al 20 %	3
Pérdida de peso superior al 20 %	PFH
Falta de acicalado	1
Pliegue cutáneo/deshidratación	1
<u>Funciones corporales</u>	
Disnea	2
Taquipnea	1

Cuadro 2. Indicador específico del procedimiento – Puntuación de la pata artrítica

0	Normal
1	Eritema e inflamación de un tobillo
2	Eritema e inflamación del tobillo y la mitad proximal de las articulaciones del tarso
3	Eritema e inflamación del tobillo y todas las articulaciones desde el tarso hasta el metatarso
4	Eritema e inflamación de toda el pie, incluidos los dedos

<u>Comportamiento</u>	
Resistencia a moverse	1
Letargia/apatía	2
Inmovilidad persistente durante menos de 24 horas	3
Inmovilidad durante más de 24 horas	PFH
Vocalización durante la manipulación	1
Vocalización, tenso y nervioso durante la manipulación	2
Vocalización al moverse/spontánea	3
Indicador específico del procedimiento	
Puntuación de la extremidad artrítica (cuadro 2)	0-8

PFH: aplicación del punto final humanitario, independientemente de la presencia o ausencia de otros signos clínicos.

Ejemplos de intervenciones adecuadas en respuesta a las puntuaciones clínicas totales

Medida que deberá tomarse	Puntuación total
Aumentar la frecuencia del seguimiento; considerar la posibilidad de administrar líquidos o cuidados	≥ 4

suplementarios	
Examinar la evolución con el veterinario	5-15
Punto final humanitario	≥ 16

Nota: Las puntuaciones totales proceden de las hojas de puntuación clínica que se han cumplimentado de acuerdo con los sistemas de puntuación que figuran en los cuadros 1 y 2. Por ejemplo, un animal que ha perdido un 12 % de su peso corporal, que ha reducido el acicalado de su pelaje y que presenta inflamación en ambos tobillos traseros tendría una puntuación total de 5.

Evaluación retrospectiva:

Se inmunizaron 36 ratas con colágeno bovino de tipo II en adyuvante incompleto de Freund (FIA). Todos los animales desarrollaron artritis, y las puntuaciones de extremidad artrítica eran de 6 en el D10. Todos los animales experimentaron una pérdida de peso de entre un 5 % y un 10 %. Las mediciones del diámetro de las articulaciones indicaron un cambio significativo respecto a los datos iniciales. Las observaciones clínicas diarias incluían falta de acicalado, resistencia a moverse, apatía, vocalización durante la manipulación (durante la observación y en los cambios de cubeta), disminución de la ingesta de alimentos y períodos de inmovilidad.

- Se utilizaron 12 animales en el grupo tratado con solución salina. Las puntuaciones más altas de la extremidad artrítica de todas las mediciones se situaron entre 6 y 8 (D13, D16, D20 y D24). Las mediciones del diámetro de las articulaciones indicaron igualmente aumentos significativos respecto a los valores iniciales en el momento de cada medición. Las puntuaciones clínicas oscilaron entre 4 y 8, con una pérdida de peso corporal de entre un 5 % y un 15 %, salvo en el caso de un animal que alcanzó una pérdida de peso del 21 % el D17, cuando fue sacrificado de modo incruento.

Evaluación retrospectiva: SEVERA

- Se trató a 12 animales con una dosis **baja** del FÁRMACO A. En todos los animales, la puntuación de extremidad artrítica no varió respecto a la del grupo de animales tratados con solución salina hasta el D16.
En el D20, un animal tenía una puntuación de extremidad artrítica de 8 y la puntuación de los demás oscilaba entre 6 y 7.
- En el D24, 5 animales mostraron una puntuación de extremidad artrítica ligeramente inferior (5 a 7). Los signos clínicos de estos animales indicaron cierta mejora, su peso corporal aún había disminuido entre un 5 % y un 10 %, y su movilidad en la caja siguió siendo reducida.

Los otros 7 animales no mostraron una reducción de los signos artríticos y clínicos en comparación con el grupo tratado con solución salina.

Evaluación retrospectiva: SEVERA

- Se trató a 12 animales con una dosis **alta** del FÁRMACO A. En el D13, las puntuaciones de extremidad artrítica eran de 4 a 6, y los diámetros de las articulaciones mostraron un aumento no significativo. Los signos clínicos señalaban falta de acicalado y una pérdida de peso inferior al 10 %. El D16, las puntuaciones de extremidad artrítica disminuyeron a 4 y los diámetros de las articulaciones mostraron reducciones significativas. El peso corporal se estabilizó el D16. En algunos animales aún se observaba resistencia a moverse. A partir del D20, la inflamación de las articulaciones se redujo a una puntuación de entre 2 y 4. Se observaron comportamientos normales en la cubeta. El peso corporal recuperó su nivel anterior al procedimiento.

Evaluación retrospectiva: SEVERA

Nota: Al final del estudio, en el tercer grupo de 12 animales, el fármaco sometido a estudio «FÁRMACO A» administrado a una dosis **alta** demostró su eficacia para reducir la clasificación real a moderada. Sin embargo, debido a que el modelo exigía que todos los animales desarrollaran plenamente artritis antes del comienzo del tratamiento, momento en que los animales mostraron signos clínicos correspondientes a una clasificación «severa», la clasificación de la severidad real para estos animales siguió siendo **severa**.

Como este proyecto incluye procedimientos severos, el usuario debe realizar evaluaciones continuas de la severidad en contacto con el órgano de control del bienestar animal, el personal técnico de animales de laboratorio y el veterinario designado, para asegurarse de que se apliquen continuamente el reemplazo, la reducción y el refinamiento.

Ejemplos ilustrativos del proceso de evaluación de la severidad

Modelo 4 – Ictus

Última actualización: 02 octubre 2014

Contexto general

El ictus se define como la pérdida o alteración de las funciones corporales normales resultante de un suministro insuficiente de sangre a parte del cerebro. A pesar de que conocemos mejor la patofisiología de las lesiones vasculares cerebrales, un tratamiento eficaz para el ictus sigue siendo una importante necesidad médica no satisfecha, y se sigue investigando para encontrar medidas preventivas y terapéuticas.

Las personas sufren tres tipos de ictus: isquémico, hemorragia intracerebral y hemorragia subaracnoidea, pero la mayoría de los modelos con animales existentes actualmente se basan en el ictus isquémico. Por su propia naturaleza, los modelos de ictus representan todo un reto desde la perspectiva del bienestar de los animales. Es crucial que todas las personas que intervienen en los procedimientos científicos (veterinarios, investigadores, personal técnico de animales de laboratorio y personal encargado de cuidar a los animales) interactúen y se comuniquen correctamente para garantizar un equilibrio adecuado entre lograr un modelo válido en este ámbito de investigación y minimizar el sufrimiento de los animales.

Normalmente, el ictus se provoca en roedores mediante la oclusión temporal o permanente de la arteria cerebral media (oclusión de la arteria cerebral media, modelo MCAO, por sus siglas en inglés). El modelo de «MCAO» intenta reproducir de manera experimental la isquemia cerebral localizada que tiene lugar al producirse un ictus, y se usa muy frecuentemente para estudiar los mecanismos de lesión, para identificar posibles dianas terapéuticas y para probar posibles agentes neuroprotectores. Se han descubierto diferencias entre cepas de ratones y ratas, y se ha observado la compleja e importante influencia de la edad, el sexo y las comorbilidades, como la diabetes, la hipertensión y la aterosclerosis. Mientras que los estudios preclínicos del ictus a menudo utilizan roedores machos jóvenes sanos, el efecto de factores como los antes mencionados puede estudiarse mediante modelos con condiciones

de comorbilidad (por ejemplo, ratas con hipertensión espontánea, ratas con diabetes provocada por estreptozotocina). En estos casos con condiciones de comorbilidad pueden ser necesarias observaciones más meticulosas de los signos clínicos y puntos finales humanitarios (PFH) más tempranos.

En el diseño de un estudio estándar, los animales son entrenados para realizar ciertas pruebas de comportamiento antes del procedimiento de MCAO. Durante el período terapéutico, establecido de acuerdo con el mecanismo de acción del fármaco y el objetivo del estudio, los animales reciben el compuesto que se desea probar. El análisis de los resultados debe incluir información sobre el tamaño del infarto, la tasa de mortalidad, la frecuencia de complicaciones (por ejemplo, hemorragia subaracnoidea), junto con la evaluación funcional y neurológica para realizar un seguimiento de los avances. Se ha demostrado que las resonancias magnéticas en serie son un instrumento muy útil para obtener información sobre la variación del tamaño del infarto a lo largo del tiempo, pero también pueden ofrecer información adicional sobre el flujo sanguíneo o el estado metabólico. Asimismo, se pueden incluir puntos finales histológicos, bioquímicos y moleculares.

Existen diversas pruebas de comportamiento que pueden aplicarse a los modelos de ictus. Las pruebas más sencillas incluyen sistemas de puntuación neurológica, que evalúan el estado neurológico en general, y pruebas de posicionamiento de las extremidades, que se usan para medir los reflejos motores. Estas pruebas se utilizan generalmente para evaluar a los animales en fase aguda tras el ictus. En los estudios de larga duración pueden utilizarse pruebas más complejas para evaluar las funciones sensoriales y motoras (por ejemplo, la prueba de etiqueta adhesiva bilateral, caminar sobre una barra, experimentos con barras giratorias o escaleras) y funciones cognitivas, como la memoria (por ejemplo, pruebas de evitación pasiva o evaluaciones de estrategias de aprendizaje).

Una buena práctica consiste en realizar un grupo de pruebas de comportamiento, incluyendo al menos una para cada fase (aguda o de larga duración), a fin de reunir información completa sobre los efectos en las funciones sensoriales, motoras y cognitivas. Estas pruebas deben elegirse cuidadosamente para detectar todos los efectos de las posibles estrategias terapéuticas. Aquí no se presentan descripciones detalladas de cada una de estas pruebas de comportamiento, que incluyen programas de entrenamiento, pero en Schaar *et al.* (2010) puede encontrarse una amplia referencia y exposición de su uso.

Referencias

- Braeuninger S and Kleinschnitz C., Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, noviembre de 2009; 1:8.
- Freret T and Bouet V., Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31.
- Graham SM *et al.*, Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, octubre de 2004; 54(5): 486-496.
- Yanamoto H *et al.*, Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, agosto de 2003; 182(2):261-74.
- Liu S *et al.*, Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1ª edición). *Journal of experimental stroke and translational medicine*, enero de 2009 1; 2(2):2-27.
- Schaar KL *et al.*, Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2010; 2: 13; libre acceso en <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13>.
- Virley *et al.*, A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000; 20: 563-582.

Estudio

Eficacia de un nuevo agente terapéutico en la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) con un filamento intraluminal

En este ejemplo, 40 ratas jóvenes Sprague-Dawley (300 a 350 g) serán sometidas a una oclusión de la arteria cerebral media mediante la técnica de filamento intraluminal con anestesia general. Las ratas se seleccionarán aleatoriamente (n=10 por grupo) para recibir ya sea el vehículo (10 ml/kg) o un nuevo agente terapéutico (compuesto A) en dosis de 1, 3 o 10 mg/kg, mediante infusión intravenosa en una vena de la cola durante una hora, comenzando 30 minutos después de la oclusión. Se administrarán dosis posteriores (ya sea de vehículo o de dosis de 1, 3 o 10 mg/kg del compuesto A) por vía intraperitoneal 6 y 24 horas después de la oclusión. Las ratas se alojarán inicialmente en cubetas dobles con suelo sólido y un lecho grueso y material para anidar. Los alimentos se restringirán durante la fase anterior al entrenamiento para facilitar la realización de la prueba de escalera, que es una tarea motivada por el apetito. Los animales recibirán alimentos *ad libitum* desde 6 horas antes de la cirugía hasta 6 días después de la oclusión para promover la recuperación postoperatoria y de peso.

Los resultados funcionales se evaluarán diariamente mediante un sistema de puntuación neurológica (la escala de Bederson; véase Schaar *et al.* 2010) y pruebas de comportamiento (prueba de la etiqueta adhesiva bilateral y caminar sobre una barra). La prueba de la escalera también se realizará diariamente desde el séptimo días después de la oclusión, a fin de dar tiempo suficiente para la recuperación postoperatoria antes de volver a restringir los alimentos. No se prevé que las pruebas de comportamiento causen una angustia significativa. Se realizarán resonancias magnéticas de las ratas anestesiadas los días 1, 7, 14 y 28 para evaluar el volumen de la lesión. Todos los animales se sacrificarán 28 días después de la oclusión.

Evaluación inicial prospectiva y consideración de refinamientos específicos y puntos finales humanitarios

¿Qué acciones lleva a cabo este estudio en los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento podría causar? ¿Qué podría empeorarlo?	¿Cómo se reducirá al mínimo el sufrimiento?
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones
Entrenamiento prequirúrgico con pruebas de comportamiento durante un período de dos a tres semanas: prueba de etiqueta adhesiva bilateral (para abandono contralateral), caminar sobre una barra (para la coordinación de las extremidades posteriores) y prueba de la escalera (para entrenar la extensión de las extremidades anteriores)	Se puede causar estrés o ansiedad mínimos antes de que los animales se habitúen a las pruebas, ya que estas implican trasladar a los animales a nuevas estancias o ambientales.	Los animales se retirarán de la sesión si se observan signos de angustia. Los animales que no alcancen el nivel inicial en un plazo establecido se excluirán del estudio.

Restricción de alimentos (hasta el 85 % y el 90 % del peso con alimentación libre) antes de la operación y a partir del día 7 después de la oclusión para facilitar la ejecución de la prueba de la escalera	Hambre ligera, posibilidad de frustración y ansiedad.	La pérdida de peso no superará el 10 %, de lo contrario se suspenderá la restricción de alimentos.	Si se observan problemas de comportamiento debido a la falta de alimentos, los animales se retirarán del estudio.
Oclusión pasajera (90 minutos) de la arteria cerebral media bajo anestesia general, utilizando un filamento intraluminal a través de la arteria carótida común	Dolor y malestar asociados a la cirugía. Posibilidad de complicaciones quirúrgicas imprevistas, por ejemplo, hemorragia subaracnoidea, lesión ipsilateral de la retina, formación de trombos intraluminales, edema cerebral, interferencia en el hipotálamo con la consiguiente hipertermia o necrosis temporal de músculos. Estas complicaciones pueden presentarse de diferentes maneras, por ejemplo, colapso repentino, parálisis, inclinación severa de la cabeza, convulsiones. Aversión y posibles efectos de la anestesia sobre las variables fisiológicas (como hipotermia, hipotensión,	Uso de anestesia adecuada y mínimamente aversiva, con analgésicos adecuados (es decir, eficaces pero con propiedades neuroprotectoras mínimas) Cirujano cualificado en la aplicación de una técnica quirúrgica aséptica (con examen periódico nivel de éxito). Mantenimiento de la homeostasis durante la anestesia. Uso de monofilamentos y técnicas quirúrgicas normalizadas para reducir la variabilidad y las complicaciones	Los animales se sacrificarán de modo inminente en los siguientes casos: • Si se producen problemas técnicos graves durante la cirugía. • Si no se recuperan de la anestesia. • Si se observan signos de complicaciones quirúrgicas imprevistas. • Si los animales pierden más del 20 % de su peso antes de la cirugía a pesar de la alimentación adicional y la rehidratación, o si

	hipoxia).	derivadas de lesiones extensas. Cuidado postoperatorio intensivo durante los primeros tres a cinco días, por ejemplo, fuentes de calor externas. Control periódico del peso corporal; observación diaria y cuidado de las heridas Fácil acceso a los alimentos y el agua durante el período de recuperación, o alimentos adicionales (papilla, líquidos) y ayuda para alimentarse en caso necesario; rehidratación (por ejemplo, mediante inyección de solución salina), de ser necesario.	permanecen inmóviles durante más de 24 horas.
Se realizarán pruebas de comportamiento (prueba de la etiqueta adhesiva bilateral y prueba de caminar sobre una	Las pruebas pueden causar estrés a los animales si no cuentan con todas sus capacidades motoras.	Seguimiento de los indicadores de ansiedad o angustia. Un personal experimentado observará	Normalmente se establece un tiempo máximo (interrupción) para realizar la tarea requerida y se concede

barra) a diario del día 1 al 28 después de la oclusión; la prueba de la escalera se efectuará diariamente a partir del día 7 después de la oclusión		continuanamente a los animales.	una puntuación final.
Administración de un nuevo agente terapéutico por vía subcutánea, intravenosa o intraperitoneal antes y/o después de la cirugía (profilaxis/terapia)	Malestar pasajero debido a la vía de administración. No se prevén efectos adversos con las dosis que se administrarán.	Administración de acuerdo con buenas prácticas, utilizando las vías y técnicas menos dolorosas o angustiantes que permitan los objetivos científicos. Se observará detenidamente si los animales muestran efectos adversos a las sustancias del estudio	Los animales se sacrificarán de modo humanitario si se observan efectos secundarios severos causados por los nuevos agentes terapéuticos.
Resonancias magnéticas longitudinales bajo anestesia los días 1, 7, 14 y 28 después de la oclusión	Repetición de la anestesia. Aversión y posibles efectos de la anestesia en variables fisiológicas (como hipotermia, hipotensión, hipoxia)	Uso de anestésicos adecuados y mínimamente aversivos. Mantenimiento de la homeostasis durante la anestesia, por ejemplo, terapia a base de fluidos antes o durante la anestesia si se presentan problemas de deshidratación, o calor para mantener la temperatura normal.	Se sacrificará de modo humanitario a los animales que no se recuperen plenamente de la anestesia. Los animales se sacrificarán de modo humanitario si no se puede mantener la homeostasis después de la recuperación.

--	--	--	--

Análisis

Este modelo se considera SEVERO debido al procedimiento quirúrgico que utiliza, los efectos adversos (generalmente pasajeros) que tiene la oclusión de la arteria cerebral media en el bienestar del animal y la posibilidad de que se produzcan complicaciones perioperatorias importantes. No obstante, el efecto negativo en el bienestar de los animales puede reducirse mediante cuidados postoperatorios intensivos durante al menos las primeras 48 horas y un estrecho seguimiento de la fase posterior, tomando rápidamente medidas en caso de que se presenten problemas. Desde un punto de vista experimental, si se presta atención al refinamiento y la normalización de cada uno de los procedimientos, es posible reducir la incidencia de complicaciones y la variabilidad y, por consiguiente, obtener datos de una mejor calidad y disminuir el número de animales utilizados.

Por consiguiente, resulta adecuada una clasificación prospectiva de la severidad como SEVERA.

¿Podría ser la clasificación MODERADA?

Aunque la clasificación prospectiva de este modelo siempre debería ser SEVERA por los motivos antes expuestos, es posible reducir la incidencia de los efectos severos en manos de técnicos experimentados, junto con la supervisión de veterinarios expertos y un buen cuidado de los animales, e intervenciones rápidas acordadas en caso de surgir complicaciones. Podría autorizarse una clasificación MODERADA en algunos casos, pero solo si son realizados por grupos de investigación que cuentan con experiencia demostrada en este modelo y se reconoce que pueden utilizarlo sin superar un sufrimiento moderado.

Observaciones clínicas

Los animales son objeto de un seguimiento muy detallado en el período postoperatorio. Se administran analgésicos y terapia de apoyo local en caso necesario.

Al final de este modelo se presenta un ejemplo de sistema combinado de puntuación neurológica y clínica que se utiliza para ayudar al seguimiento del estado clínico de los animales a todo lo largo del procedimiento.

Resultados

Todos los animales, excepto uno del grupo tratado con el vehículo, se recuperaron de la cirugía sin complicaciones imprevistas gracias al cuidado perioperatorio intensivo prestado.

- Los 10 animales tratados con el vehículo obtuvieron la puntuación neurológica más baja a lo largo de todo el estudio, así como un bajo rendimiento en las pruebas de comportamiento en comparación con los animales tratados con el agente del estudio. La puntuación clínica fue similar a la de los animales tratados con el agente en el período inmediato (primeras 48 horas) después de la oclusión; a partir de ese momento, se observaron diferencias entre los animales del grupo al que se administró el vehículo:
 - Uno de los 10 animales tuvo que ser sacrificado el día 2 después de la cirugía por haber perdido más del 20 % de su peso corporal (a pesar de recibir alimentación adicional y rehidratación).
Evaluación: SEVERA.
 - De los 10 animales, 6 desarrollaron deficiencias neurológicas moderadas, pero mostraron una mejora mínima en la puntuación clínica con el paso del tiempo.
Evaluación: SEVERA.
 - De los 10 animales, 3 desarrollaron deficiencias neurológicas moderadas y mostraron una reducción gradual de la puntuación clínica con el tiempo, que posiblemente sea resultado de su capacidad para compensar y adaptarse a deficiencias neurológicas de larga duración.
Evaluación: MODERADA.
- Los 20 animales tratados con dosis bajas (de 1 a 3 mg/kg) del compuesto A mostraron una mejora de la puntuación neurológica 48 horas después de la oclusión, así como una mejora de la puntuación clínica.
Evaluación: MODERADA.

- Los 10 animales tratados con la dosis más alta (10 mg/kg) del compuesto A mostraron una mejora de la puntuación neurológica respecto al grupo al que se administró el vehículo 24 horas después de la oclusión, una pérdida mínima (5 %) de peso corporal 24 horas después de la cirugía, y una mejora importante de la puntuación clínica 48 horas después de la oclusión.
Evaluación: MODERADA.

Evaluación de la severidad real

La clasificación de 7 animales se consideró **SEVERA** y la de 33 animales **MODERADA**.

Sistema de puntuación

La evaluación de la severidad se lleva a cabo mediante una combinación de observaciones clínicas de carácter general (peso corporal, aspecto, comportamiento, entorno de la cubeta), junto con una evaluación neurológica específica del procedimiento. La escala de Bederson es una evaluación neurológica general que se desarrolló para medir las deficiencias neurológicas tras un ictus. Utiliza una escala de 0 a 3, en la que 0 corresponde a la normalidad y 3 al mayor nivel de discapacidad. Las pruebas incluyen flexión de las extremidades anteriores, resistencia al empuje lateral y comportamiento al girar en círculos.

Puntuación 0: no se observan deficiencias.

Puntuación 1: flexión de las extremidades anteriores.

Puntuación 2: resistencia disminuida al empuje lateral (y flexión de las extremidades anteriores) sin movimiento en círculo.

Puntuación 3: mismo comportamiento que en la puntuación 2 con movimiento en círculo.

PFH: Punto final humanitario.

Acciones	
Puntuación 1	Revisar la frecuencia del seguimiento
	Preparación cuidados e implementación

	Puntuación
Aspecto	
Pérdida de peso del 5 % al 10 %	1
Pérdida de peso del 11 % al 15 %	2
Pérdida de peso del 16 % al 20 %	3
Pérdida de peso superior al 20 %	PFH
Pelaje ligeramente descuidado	1
Piloerección ligera	2
Piloerección marcada	3
Comportamiento	
Locomoción ligeramente anormal	1
Locomoción sumamente anormal	2
Grandes problemas de movilidad	3
Inmovilidad durante más de 24 horas	PFH
Tenso y nervioso durante la manipulación	2
Muy angustiado durante la manipulación, por ejemplo, con temblores, vocalización, agresividad	3

Entorno	
Nido ligeramente desorganizado	1
Nido apenas reconocible	2
No existe un nido	3
Puntuación neurológica	
Flexión de las extremidades anteriores	1
Resistencia disminuida al empuje lateral (y flexión de las extremidades anteriores) sin movimiento en círculo	2
Mismo comportamiento que en la puntuación 2, con movimiento en círculo	3

Acciones – Cabe señalar que como generalmente se observan complicaciones quirúrgicas en el período de recuperación inmediatamente posterior a la intervención quirúrgica, es esencial realizar un estrecho seguimiento y emitir un juicio experto y empático durante las primeras 24 horas, a fin de identificar los efectos adversos y tomar medidas para contrarrestarlos, y los animales se sacrifican de modo incruento si su sufrimiento supera la categoría de severo.

Ejemplo de una hoja de observación individual (días 0 a 4)

Día	0	1	2	3	4
<u>Aspecto</u>					
Peso corporal (g) (puntuación)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
<u>Estado del pelaje</u>					
Pelaje descuidado/piloerección	1	1	0	1	0
<u>Comportamientos</u>					
Locomoción	3	2	2	2	1
Respuesta a la manipulación	0	0	2	0	0
<u>Entorno</u>					
Estado del nido	3	2	1	0	0
<u>Puntuación neurológica específica del procedimiento</u>	2	2	1	1	1
Puntuación total	9	8	8	5	3
Volumen de las lesiones (evaluación mediante resonancia magnética)*		11 %			

<u>Otras observaciones</u>	Se recuperó sin complicaciones de la cirugía Administración del agente a los 30 minutos y a las 6 horas	Se mueve alrededor de la cubeta y ha intentado construir un nido	Ansiedad inicial en las pruebas de comportamiento, pero las completó todas; el nido está más estructurado	Hoy tiene el pelaje menos acicalado, pero su peso es estable y el nido es correcto	Completó las pruebas de comportamiento, menos ansiedad, mejora considerable de la locomoción
-----------------------------------	--	--	---	--	--

* Se incluye el «volumen de las lesiones» (evaluado mediante resonancia magnética) para que el investigador lo rellene al final del estudio. Se puede establecer una correlación entre estos datos y las observaciones clínicas y de comportamiento para refinar aún más el seguimiento, el cuidado de los animales y los procedimientos.

Ejemplos ilustrativos del proceso de evaluación de la severidad

Modelo 5 – Producción de anticuerpos policlonales en conejos

Última actualización: 02 octubre 2014

Contexto general

El principal objetivo de la producción de anticuerpos en animales de laboratorio es obtener sueros inmunológicos de valor y afinidad elevados para usar en experimentos o pruebas de diagnóstico.

Gran parte de la biología y la bioquímica modernas se basa en la existencia de anticuerpos sumamente específicos para usar en diversas técnicas, como el diagnóstico inmunohistoquímico, ELISA, la inmunoprecipitación y la inmunotransferencia. Así pues, la generación de grandes cantidades de anticuerpos específicos dirigidos a proteínas o péptidos de interés es esencial para el éxito de muchos programas de investigación fundamental y aplicada.

En este ejemplo se utilizará un conejo para producir anticuerpos frente a péptidos pequeños que se consideran importantes para la regulación de la división de las células, como parte de un programa de investigación que comprende estudios bioquímicos sobre la división celular en mamíferos.

Referencias

- Canadian Council on Animal Care guidelines on; antibody production (2002). Descargable en: http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf.
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H et al.) (2001), A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**: 15-23.
- JWGR (2001), Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals* **35**: 1-41.
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012), Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE* **7(9)**: e44437 (libre acceso, <http://www.plosone.org>).
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005), Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal* **46**:269-279.

- Stills HF (2005), Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal* **46**:280-293.
- UFAW/RSPCA (2008), *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, Reino Unido: RSPCA (descarga gratuita en: <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>).

Estudio

Mediante experimentos anteriores se determinó que un solo conejo debe producir material suficiente para cada péptido de interés. El conejo se alojará en un corral con suelo firme dentro de un grupo estable de conejos compatibles (usados también para la producción de anticuerpos), con suficiente espacio para permitir el enriquecimiento, hacer ejercicio y mantener un comportamiento social normal (UFAW/RSPCA 2008). El animal se inmunizará con una mezcla de antígeno y adyuvante. En momentos predeterminados se recogerán pequeñas muestras de sangre para establecer si la inmunización ha tenido éxito. Cuando se haya obtenido una cantidad adecuada de anticuerpos, se desangrará al animal bajo anestesia profunda sin recuperación para obtener los anticuerpos presentes en la sangre.

La manipulación de los conejos puede causar estrés, por lo que solo debe ser efectuada por un personal competente y empático. El comportamiento de los conejos puede resultar difícil de interpretar, y una buena práctica consiste en mantenerse actualizado consultando la bibliografía sobre el comportamiento y el bienestar de los conejos. Por ejemplo, un estudio publicado recientemente indica que los conejos pueden mostrar «caras de dolor» (o expresiones faciales de dolor) en determinadas circunstancias (Keating *et al.* 2012), por lo que se debe estudiar caso por caso la posibilidad de utilizar esta característica como una herramienta para evaluar el bienestar.

Debido a la baja inmunogenicidad del péptido de cadena corta, será necesario administrarlo en combinación con un adyuvante. Con anterioridad se ha utilizado el adyuvante completo de Freund (FCA), pero actualmente existen adyuvantes sintéticos que también resultan eficaces para este procedimiento y son muy poco irritantes.

Evaluación inicial prospectiva y consideración de refinamientos específicos y puntos finales humanitarios

¿Qué acciones lleva a cabo este estudio en los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento podría causar? ¿Qué podría empeorarlo?	¿Cómo se reducirá al mínimo el sufrimiento?
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones
	Puntos finales	
Inmunización con antígeno y adyuvante; tres inyecciones subcutáneas los días 8, 22 y 37	Malestar tras la inyección. Se pueden desarrollar hinchazón no dolorosa como respuesta al adyuvante Posibilidad (escasa) de ulceración en el lugar de la inyección .	El volumen, la formulación y la frecuencia de las inyecciones se adoptarán de acuerdo con directrices sobre buenas prácticas (por ejemplo, EFPIA/ECVAM o JWGR), normalmente un máximo de 4 puntos y 0,25 ml por lugar. Las posibles úlceras recibirán de inmediato el tratamiento veterinario adecuado.
Toma de muestras de sangre para evaluar las respuestas de los anticuerpos (hasta 5 extracciones)	Captura, manipulación y confinamiento que pueden causar estrés. Ligero malestar asociado a las agujas de las jeringuilla.s Bajo riesgo de hemorragia o de formación de hematomas.	Si el procedimiento causa un estrés extremo en el animal, la toma de muestras se retrasará hasta que el comportamiento del animal vuelva a ser normal .

Sangrado bajo anestesia general	Ligero malestar y posible aversión al agente durante la inducción de la anestesia	Se utilizarán agentes anestésicos muy poco repulsivos	El animal permanecerá anestesiado hasta su muerte
---------------------------------	---	---	---

Análisis

Solo se prevé una severidad leve gracias a los refinamientos de los procedimientos de manejo y alojamiento y los cuidados, las buenas prácticas de administración y toma de muestras, y la elección de un adyuvante muy poco irritante.

Por consiguiente, una clasificación prospectiva de la severidad como LEVE es adecuada.

¿Podría refinarse aún más el procedimiento?

La posibilidad de utilizar adyuvantes muy poco irritantes y agentes anestésicos menos repulsivos debe examinarse periódicamente mediante un seguimiento de la bibliografía y abordando la cuestión con otros investigadores. A fin de reducir aún más el estrés, podría establecerse un programa para habitar a conejos jóvenes a la manipulación (UFAW/RSPCA, 2008).

Observaciones clínicas

Como en este estudio se esperaban únicamente efectos adversos de menor importancia, se utilizó un sistema de seguimiento básico, es decir, se controlaban los animales cada día y se registraban las observaciones, pero no se consideró necesaria una hoja de registro estructurada.

Al final de este modelo figura un ejemplo ilustrativo de una hoja de observación.

Evaluación de la severidad real

Se registró una ligera inflamación pasajera en el lugar de la inyección, pero no requirió tratamiento. El conejo prestó cierta atención a los puntos de las inyección durante poco tiempo, pero se consideró que ello indicaba tan solo un malestar leve. No se observaron «caras de dolor» (expresiones faciales de dolor).

No se observaron efectos adversos debido a la toma de muestras de sangre desde una vena de la oreja.

Una clasificación real **LEVE** se consideró adecuada para este animal.

Ejemplo de hoja de observación

Producción de anticuerpos en conejos – Hoja de procedimiento y observación		
Fecha	Peso corporal (kg)	Observaciones
1/3	3,5	Sangrado previo – 5 ml de una vena de la oreja; no se observaron efectos adversos
2/3		Ninguna anomalía detectada (NAD)
6/3		NAD
7/3		NAD
8/3	3,6	Inmunización – 0,25 ml en 2 puntos de inyección por vía subcutánea,

		ligera atención a los puntos de administración (acicalado) durante varios minutos, antes de regresar a la normalidad
9/3		NAD
10/3		NAD
11/3		NAD
12/3		Ligera inflamación sin tensión y no dolorosa en el lado izquierdo
13/3		Continúa la inflamación en el lado izquierdo; no ha empeorado
14/3		Se mantiene la inflamación en el lado izquierdo, pero no duele al palparla
15/3	3,6	Ha desaparecido la inflamación; todo normal
21/3		NAD
22/3	3,6	Inmunización – 0,25 ml en 2 puntos de inyección por vía subcutánea, breve atención a dichos puntos de inyección
28/9		NAD
29/3	3,7	NAD
30/3		Sangrado de prueba – 2 ml de una vena de la oreja; sin efectos adversos
5/4		NAD

6/4	3,6	Inmunización – 0,25 ml en 2 puntos de inyección
14/4	3,6	NAD
15/4		Sangrado de prueba – 2 ml de una vena de la oreja; sin efectos adversos
26/4		NAD
27/4	3,6	Exanguinación bajo anestesia general; sin efectos adversos

Es necesario disponer de un registro que confirme que se ha controlado a los animales al menos una vez al día, por ejemplo, en el registro de cada animal (como en el caso anterior) o en el registro de sala.

Ejemplos ilustrativos del proceso de evaluación de la severidad

Modelo 6 – Producción y mantenimiento de animales modificados genéticamente

Última actualización: 02 octubre 2014

1. Contexto general

El uso de animales modificados genéticamente en la investigación ha contribuido a comprender la función de los genes y sus respectivas proteínas. Distintos fenotipos tienen efectos diversos en el bienestar de los animales, y algunos pueden causar dolor, sufrimiento o angustia. Si bien algunos fenotipos y resultados son predecibles, durante la creación de animales modificados genéticamente pueden producirse muchos efectos inesperados o secundarios, de modo que no siempre es posible predecir la severidad con precisión. En la práctica en muchas líneas de animales modificados genéticamente el fenotipo no se ve afectado y se pueden establecer protocolos de evaluación para garantizar la detección de los fenotipos adversos. Alternativamente el fenotipo previsto puede asociarse a fenotipos secundarios imprevistos que se manifiestan en diferentes momentos y que pueden verse afectados por diversos factores medioambientales.

Al evaluar el daño real que sufre el animal deben tenerse en cuenta varios factores, como el tipo de mutación, el genotipo, el fenotipo y la estrategia de reproducción (por ejemplo, evitar fenotipos homocigóticos nocivos mediante el cruzamiento de heterocigotos x no mutantes), así como la naturaleza de los procedimientos científicos y zootécnicos adicionales y los posibles efectos de todos ellos. Se requieren observaciones sistemáticas en el momento oportuno, tanto durante la progresión de la colonia como a lo largo de toda la fase experimental de una colonia, para evaluar de forma eficaz el estado del bienestar de los animales.

Las nuevas líneas deben ser objeto de un seguimiento detallado y de una evaluación normalizada del bienestar. Todas las líneas deben ser evaluadas de forma individual por parte de personal competente con la formación adecuada durante la progresión y mantenimiento de la colonia, y la información sobre los efectos adversos observados debe recopilarse y transmitirse. El personal autorizado debe llevar a cabo los procedimientos científicos previstos y hacer el seguimiento y registrar los efectos observados en los animales, junto con el personal encargado del cuidado de estos. Deben establecerse prospectivamente puntos finales humanitarios basados en parámetros como la pérdida de peso, el estado corporal y los comportamientos problemáticos,

junto con características de desarrollo específicas. Ningún animal debe mantenerse con vida si supera los límites de severidad previstos, a menos que presente un interés científico convincente y únicamente con permiso de la autoridad competente.

La naturaleza, el momento y la duración de las observaciones dependerán de varios factores además de la mutación aplicada. Por ejemplo, el fondo genético y las condiciones medioambientales en las que se mantiene a los animales pueden alterar considerablemente la expresión del fenotipo. Estos factores específicos deben anotarse con precisión para facilitar las comparaciones entre instalaciones y el seguimiento de animales modificados genéticamente en general. También debe tenerse en cuenta la vida media de cada línea en una instalación determinada, ya que algunos fenotipos aparecen de forma tardía, de modo que solo pueden observarse si se mantiene a los animales durante períodos más largos.

Referencias

RSPCA GA Passport Working Group (2010), *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (descargable en: <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>).

Wells DJ et al (2006), *Assessing the welfare of genetically altered mice*, *Laboratory Animals* 40(2): 111-114 (descargable en: <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>).

2. Ejemplos

Los tres ejemplos que se presentan en las secciones 2.1 a 2.3 a continuación ilustran cómo se puede evaluar la severidad en ratones modificados genéticamente e incluyen una revisión de las etapas de desarrollo, los efectos del procedimiento y el desarrollo de la colonia. Cada ejemplo se centra en los principios de la evaluación de la severidad, en lugar de tener en cuenta todas las hipótesis posibles en el desarrollo de la colonia.

La creación de cada modelo seguirá procedimientos normalizados que requieren la preparación quirúrgica de los machos vasectomizados, la manipulación de los embriones y la implantación quirúrgica en las hembras pseudogestantes. Se supone la aplicación de buenas prácticas en materia de asepsia, gestión del dolor y competencia del cirujano.

La confirmación de la presencia de la mutación en el fundador o en la progenie de su línea germinal se llevará a cabo a partir de muestras de tejidos obtenidas como producto secundario de la identificación (marcado de las orejas) o mediante el método menos invasivo que suministre tejido suficiente para evaluar el genotipo. La estrategia para la determinación del fenotipo de cada línea dependerá del gen, el ámbito de investigación y los efectos previstos. Una serie de observaciones normalizadas determinará la evaluación de la severidad.

2.1. Modelo de ratón genéticamente alterado – *GenA^{tm1a(Funding)Lab}*

2.1.1. Contexto general

Se creó una colonia de ratones con una nueva mutación en el *Gen A*, por mutagénesis dirigida en una línea de células madre embrionarias derivada de un fondo genético C57BL/6N con un efecto fenotípico desconocido. El modelo se mantuvo en un fondo genético definido (C57BL/6N). Una vez que se estableció la transmisión a línea germinal en los ratones de la primera generación, se llevó a cabo una evaluación básica del bienestar utilizando para ellos a 30 crías procedentes de 3 a 5 camadas pertenecientes a distintos cruces. La progenie fue objeto de seguimiento en momentos predeterminados del desarrollo de la colonia: en el momento del nacimiento, a los 14 días de vida (junto con la identificación de las crías y la recuperación de tejido para determinar el genotipo) y en el momento del destete. Se elaboró una hoja de puntación adecuada basada en el sistema de evaluación del bienestar de los animales modificados genéticamente (Wells *et al.* 2006). El personal técnico de animales de laboratorio realizó las observaciones de las crías en la cubeta, y los encargados de las colonias hicieron un seguimiento de las proporciones entre genotipos. En la medida de lo posible, los ratones se alojaron en grupo después del destete en cubetas con ventilación individual con lecho, material para anidar y el enriquecimiento medioambiental necesario. El personal técnico de animales de laboratorio llevó a cabo evaluaciones en la cubeta durante su interacción diaria hasta que los ratones alcanzaron la madurez sexual. Se realizaron y registraron evaluaciones a largo plazo de los efectos adversos para el bienestar relacionados con la edad en los animales de la colonia y animales asignados a la reproducción,. Todas las observaciones se compararon con el fondo genético original y se evaluó su relevancia.

2.1.2. Evaluación prospectiva

¿Qué acciones lleva a cabo este estudio en los	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento podría causar? ¿Qué	¿Cómo se reducirá al mínimo el sufrimiento?
--	--	---

animales?	podría empeorarlo?		
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones	Puntos finales
Efectos básicos de la modificación genética	La modificación genética puede tener efectos clínicos adversos. En los casos en que estos son impredecibles, cualquier indicio de que los animales con la mutación se han apartado de parámetros físicos o de comportamiento normales (es decir, aquellos que se sabe que se producen en fenotipos relacionados con el antecedente genético o en grupos de control de tipo silvestre) pueden poner de manifiesto un problema de bienestar.	Seguimiento continuo en la propia cubeta. Evaluación del bienestar en momentos determinados del desarrollo: nacimiento, destete y madurez sexual. Dependiendo de la naturaleza de los efectos adversos detectados, se aplicarán factores de mejora adecuados en la medida de lo posible, como distintas estrategias de reproducción o refinamientos zootécnicos (por ejemplo, aumento del material para anidar a fin de ayudar a regular la temperatura).	Los animales se sacrificarán si la severidad excede un nivel moderado.
Toma de muestras de tejidos para determinar genotipos	Posibilidad de dolor y angustia debido al método para tomar muestras de tejidos, por ejemplo, perforación o colocación de pendiente en la oreja o corte o de cola.	Cuando se identifique a los animales marcando las orejas es conveniente utilizar, de ser posible, el tejido de la oreja para determinar genotipos.	No aplicable, ya que el procedimiento solo se realiza una vez y es poco probable que el dolor o angustia alcance un nivel que haga necesario un sacrificio humanitario.

	Normalmente se usa una biopsia de la cola cuando se necesitan mayores cantidades de ADN, pero puede causar dolor de corta y larga duración (este último debido a la formación de neuromas).	Para el corte de la cola debe utilizarse la menor parte posible de esta (teniendo en cuenta que debe evitarse en la medida de lo posible una segunda toma de muestras); deberá utilizarse anestesia y analgésicos cuando sea apropiado, y una hemorragia excesiva debe de ser tratada rápidamente .	
		Debera hacerse un seguimiento de los avances con nuevas técnicas menos invasivas, evaluarlos y aplicarlos cuando sea posible	
Determinación de fenotipos	Estrés causado por la manipulación o la aplicación del estudio fenotípico, por ejemplo, estrés al ser colocado en un entorno desconocido, administración de compuestos experimentales para causar una respuesta, seguimiento de infecciones, anestesia y confinamiento para toma de imágenes, etc.	Formación del personal que realiza la determinación de fenotipos en técnicas competentes, empáticas y normalizadas de manipulación y observación Uso de anestesia durante la toma de imágenes o procedimientos dolorosos. Estructuración de las pruebas fenotípicas para pasar de las menos invasivas (por ejemplo, observación	Si la mutación conlleva una respuesta severa a un ensayo fenotípico, se llegará a los puntos finales humanitarios y se sacrificará a los animales

		del comportamiento en un espacio abierto) a las más invasivas (por ejemplo, procedimientos que requieren anestesia)	
--	--	---	--

El gen objeto de estudio es un nuevo mutante, aunque con efectos adversos desconocidos. La experiencia de este establecimiento muestra que la gran mayoría de los modelos similares generalmente muestran un fenotipo leve. Sin embargo, en ocasiones, un modelo manifestará de forma imprevista signos clínicos moderados y, por ende, la clasificación prospectiva de este ejemplo debería ser MODERADA.

2.1.3. Resultados

Evaluación inicial de los animales neonatos (al nacimiento)

Color de las crías (únicamente neonatos)	Normal
Actividades de las crías (únicamente neonatos)	Normal
Presencia de leche en el estómago Milium (únicamente neonatos)	Presente

Camada	Todas las crías eran conformes a los parámetros del fondo genético en lo referente al tamaño y la homogeneidad de la camada y al desarrollo y el crecimiento de las crías
---------------	---

Los siguientes indicadores se observaron 14 días después del nacimiento y en el momento del destete:

Aspecto general	Todas las crías son morfológicamente «normales» No se observaron indicios de malformaciones
Tamaño, conformación y crecimiento	Crecimiento normal de acuerdo con la curva de crecimiento típica para el fondo genético de origen
Estado del pelaje	Normal
Comportamiento: postura, locomoción, actividad e interacciones con el entorno	Comportamiento e interacciones normales entre todos los habitantes de la cubeta; no se observó hiperactividad ni agresión
Signos clínicos	No se detectaron
Tamaño relativo	Normal en comparación con el fondo genético
Números	La tasa de mortalidad antes del destete fue normal para el fondo genético

Observaciones clínicas

Todas las observaciones y ratios de los neonatos hasta el destete se consideraron normales en relación con el fondo genético (C57BL/6N), y los ratones homocigóticos, heterocigóticos y no mutantes nacieron con proporciones mendelianas normales.

A las 4 semanas de edad, siete ratones homocigóticos y siete no mutantes(7+7) fueron sometidos a una serie de pruebas de observación y procedimiento leve, como SHIRPA, dismorfología, test de campo abierto, bioquímica sanguínea clínica, DEXA y captura de imágenes de Faxitron, durante un período de 16 semanas. Al finalizar este experimento, el análisis fenotípico puso de relieve una reducción de la glucosa en los ratones homocigóticos tras una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa. Aunque la eliminación de glucosa se redujo durante la prueba, todos los animales volvieron a su estado basal después del procedimiento y no se observaron otros efectos adversos.

2.1.4. Análisis de los resultados

Evaluación de la severidad real

Tras el establecimiento de la colonia, para el mantenimiento y la progresión de la misma se utilizaron cruces de animales heterocigotes con animales sin alteración genética. No se observaron fenotipos nocivos en los ratones utilizados para la reproducción y el mantenimiento, por lo que se consideró que no mostraban efectos adversos. Puesto que no se prevén fenotipos nocivos, esta línea puede llevarse a homocigosis y mantenerse sin proyecto autorizado

El apareamiento antes indicado entre ratones heterocigóticos produjo ratones homocigóticos. Un grupo de estos ratones se utilizó para un examen estándar de fenotipos consistente en una serie de protocolos leves, que incluían la inserción de una aguja para tomar muestras de sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Ratones no mutantes se sometieron al mismo tiempo a las pruebas. El efecto acumulativo en los ratones habría sido leve, debido a la toma de muestras de sangre y a los posteriores procedimientos de determinación de fenotipos, por oposición al efecto general de la modificación genética.

Resumen

Reproducción y mantenimiento: sin efectos adversos.

Ratones homocigóticos y de control —LEVE— debido a las pruebas de detección (no al efecto de la modificación genética).

En resumen, puede considerarse que esta línea de ratones modificados genéticamente no presenta fenotipos nocivos. La reproducción de líneas establecidas no requeriría un proyecto autorizado con arreglo a la Directiva.

2.2. Modelo de ratón genéticamente alterado – *Tg(GenB)^{labcode}*

2.2.1. Contexto general

Como modelo para el estudio de una forma de cáncer se creará una colonia de ratones con una mutación que sobreexpresa un transgen. La línea se creará en un fondo genético C57BL/6N. Sin embargo, el inicio del tumor y su tasa de desarrollo no se pueden definir, y deberán evaluarse como parte de la caracterización del modelo. Una vez que se hayan establecido las líneas fundadoras, se realizará el examen básico de evaluación del bienestar que se describe en la sección 2.1. Se desarrollará la línea más útil para estudiar este tipo de leucemia.

2.2.2. Evaluación prospectiva

¿Qué acciones lleva a cabo este estudio en los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento podría causar? ¿Qué podría empeorarlo?	¿Cómo se reducirá al mínimo el sufrimiento?
	Efectos adversos	Puntos finales
Evaluación y caracterización del desarrollo del tumor	La pérdida de peso y la condición física avanzarán con el desarrollo del cáncer.	Las intervenciones se basarán en las observaciones diarias de criterios como la pérdida de peso, la pérdida de la condición física, la letargia, etc. Los animales del estudio y los reproductores que muestren signos clínicos no contemplados por los procedimientos experimentales, como una pérdida de peso superior al 15 %, mal estado del pelaje o letargia, se sacrificarán de modo humanitario.

	Las inflamaciones subcutáneas pueden causar malestar, afectar al comportamiento, la postura o la locomoción normales. Los animales pueden ser más propensos a enfermedades debido al debilitamiento del sistema inmune.	Observaciones diarias y seguimiento de la salud en general y del crecimiento del tumor.	Los animales se sacrificarán de modo humanitario si el tumor se ulcera o interfiere con el comportamiento normal, la postura o la locomoción, o si supera 1,2 cm de diámetro. Se sacrificará de modo incruento a los animales que muestren signos de enfermedades intercurrentes.
--	---	--	---

El modelo objeto de estudio se modificará para crear el trastorno genético previsto. El inicio de la enfermedad no puede predecirse con facilidad, pero pueden definirse previamente signos clínicos para poder caracterizarlo. Una vez caracterizado, el modelo debería mantenerse para poder utilizarlo en estudios experimentales posteriores sobre posibles tratamientos para el tipo de cáncer objeto de estudio. Debido a ello, la clasificación prospectiva de este ejemplo sería MODERADA.

2.2.3. Resultados

Se realizaron las evaluaciones del bienestar descritas en la sección 2.2. No se observaron anomalías en las etapas de desarrollo ni en el crecimiento hasta la madurez sexual. La colonia se amplió con animales de estudio y animales destinados a reproducción que se aparearon a partir de 10 semanas de edad para mantener la colonia y producir nuevos animales experimentales. Los animales fueron objeto de seguimiento durante todo este período, y se observó el desarrollo de tumores a partir de las 18 semanas de edad en un 60 % de los animales con la mutación. El desarrollo clínico de la enfermedad fue de 4 a 6 semanas, momento en que los animales tuvieron que ser sacrificados.

2.2.4. Análisis de los resultados

Evaluación de la severidad real

Se observó que un 60 % de los animales con la mutación desarrollaron tumores a partir de las 18 semanas de edad. La estrategia de reproducción consistió en el apareamiento de animales a partir de las 10 semanas de edad. La posibilidad de que las parejas reproductoras desarrollaran tumores se consideró suficiente para modificar la reproducción y el mantenimiento. A continuación, las parejas reproductoras se aparearon a partir de las 6 semanas de edad; las parejas se separaron al cabo de 12 semanas y los machos sementales fueron sacrificados. Las hembras de estudio y reproductoras fueron objeto de un seguimiento diario para detectar los primeros signos de desarrollo tumoral. Los animales no utilizados se sacrificaron de modo incruento antes de que aparecieran signos clínicos.

Resumen

Animales menores de 18 semanas: sin efectos adversos.

Animales mayores de 18 semanas que desarrollaron tumores: LEVE debido a los puntos finales clínicos anticipados.

Animales mayores de 18 semanas que desarrollaron tumores y utilizados: LEVE o MODERADA, dependiendo de la aplicación de puntos finales clínicos.

2.3. Modelo con ratones genéticamente alterados – *GenC^{tm1a(Funding)Lab}*

2.3.1. Contexto general

Se creó una colonia de ratones con una mutación en el *Gen C* dirigida a una línea de células madre embrionarias de fondo genético C57BL/6N con un potencial fenotípico conocido para estudiar comportamiento y la memoria. El modelo se mantuvo en un fondo genético definido (C57BL/6N). Una vez establecida la transmisión a la línea germinal en los ratones de la primera generación, se llevó a cabo un examen básico de evaluación del bienestar.

2.3.2. Evaluación prospectiva

Al igual que en el caso descrito en la sección 2.1, el gen objeto de estudio es una nueva mutación. La intención es utilizar el modelo en futuros estudios del comportamiento destinados a comprobar la eficacia de nuevos compuestos farmacéuticos. La experiencia en el establecimiento muestra que la gran mayoría de modelos similares generalmente muestran un fenotipo leve. Sin embargo, en ocasiones, un modelo manifestará de forma imprevista signos clínicos moderados y, por ende, la clasificación prospectiva de este ejemplo debería ser MODERADA.

2.3.3. Resultados

Todas las observaciones y ratios se consideraron normales en relación con el fondo genético (C57BL/6N) de este modelo, y los ratones homocigóticos, heterocigóticos y no mutantes nacieron con una distribución mendeliana normal.

A las cuatro semanas de edad, los ratones homocigóticos y los ratones no mutantes del grupo de control fueron sometidos a una serie de observaciones y pruebas para evaluar su aprendizaje y su memoria. Estas pruebas se efectuaron durante un período de diez semanas. Al finalizar este análisis fenotípico no se observaron fenotipos nocivos. A continuación, este modelo se utilizó para comprobar la eficacia de nuevos compuestos farmacéuticos.

95

El cruce de ratones heterocigóticos produjo animales homocigóticos sanos que presentaron un rendimiento reproductivo similar al de la cepa de origen. Por tanto, para reducir el número de animales, se utilizó una estrategia de reproducción basada en el apareamiento entre animales homocigóticos. A diferencia de los primeros apareamientos, en los que se obtuvieron ratones homocigóticos a partir del apareamiento entre animales heterocigóticos, los miembros del nuevo grupo de animales homocigóticos procedente del cruce de animales homocigóticos parecían más pequeños y no alcanzaron el mismo y tamaño y peso en comparación con sus hermanos.

Aunque la línea de este modelo estaba destinada originalmente a un estudio de comportamiento y memoria, se realizaron otros análisis de tejidos y sangre procedentes de estos animales. El análisis de los resultados de la bioquímica sanguínea y una posterior consulta bibliográfica permitieron descubrir que el *Gen C* es una proteína de transporte esencial que se vincula a la vitamina B12. La eliminación del *Gen C* tuvo como resultado la ruptura del mecanismo de transporte extracelular, lo que produjo deficiencias en la síntesis del ADN y del metabolismo de las grasas y las proteínas. El efecto de esta mutación no se habría observado en ratones nacidos de una hembra heterocigótica, ya que la fuente materna de vitamina B12 se transfiere dentro del útero a través de la placenta al feto en desarrollo. Los ratones knock out originales tenían pues suficiente vitamina B12 almacenada para permitirles sobrevivir y desarrollarse al menos hasta las 16 semanas, lo que garantizaba una reproducción y una fertilidad normales en comparación con la cepa de origen.

2.3.4. Análisis de los resultados

Evaluación de la severidad real

Este ejemplo demuestra que el mantenimiento de la colonia puede tener un efecto profundo y a menudo inesperado en los ratones. Según la información disponible anteriormente y los resultados de la reproducción inicial y la determinación de fenotipos, esta colonia no tendría nada excepcional. Como es lógico, el mantenimiento de una colonia con una estrategia de apareamiento entre animales homocigóticos normalmente hará que se produzca el número mínimo de animales necesario para minimizar el uso de animales. En las líneas mantenidas previamente como animales normales sin autorización para el proyecto pueden surgir fenotipos nocivos imprevistos. Como consecuencia de los efectos adversos para el bienestar de los animales de este ejemplo, este modelo deberá obtener un proyecto autorizado si se aplica este tipo de sistema de reproducción.

Resumen

Reproducción y mantenimiento de parejas heterocigóticas: sin efectos adversos.

Reproducción y mantenimiento de parejas homocigóticas: severidad MODERADA para la progenie de esta generación, debido a su pequeño tamaño y a la falta de desarrollo.

Ejemplo 2.3: este ejemplo pone de relieve la necesidad de que los establecimientos intercambien datos precisos y útiles sobre bienestar cuando puedan manifestarse fenotipos nocivos, por ejemplo, mediante un «pasaporte para ratones»ⁱ.

ⁱ RSPCA GA Passport Working Group (2010), *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, Reino Unido: RSPCA (descargable en: <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>).

