



## ACTA DE LA REUNIÓN VIRTUAL EXTRAORDINARIA DE LA COMISIÓN DE ÉTICA Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE FARMACIA, CELEBRADA EL DÍA 8 DE MARZO DE 2021

La Comisión de Ética y Experimentación Animal de la Facultad de Farmacia, celebra una sesión extraordinaria de carácter virtual, el 8 de marzo de 2021, bajo la Presidencia de la Ilma. Sra. Decana, Profa. Dra. Dña. Irene Iglesias Peinado y actúa como Secretario el Prof. Dr. D. Jesús Román Zaragoza.

El Orden del Día es el siguiente:

1. **Emisión del informe sobre la utilización del Animalario de la SD. De Fisiología para llevar a cabo el Proyecto "Identificación de nuevos factores modulares de inflamasoma en las células beta pancreáticas. Comunicación intertisular intestino-páncreas" de la Profa. Elisa Fernández Millán.**

### ASISTENTES

Prof.<sup>a</sup> Dra. D<sup>a</sup> Irene Iglesias Peinado  
Prof. Dr. D. Jesús Román Zaragoza  
Prof.<sup>a</sup> Dra. D<sup>a</sup>. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado  
Prof.<sup>a</sup> Dra. D<sup>a</sup>. Ana M<sup>a</sup>. López Sobaler  
Prof.<sup>a</sup> Dra. D<sup>a</sup>. Gloria Molero Martín-Portigués  
Prof.<sup>a</sup> D<sup>a</sup>. María Almudena Porras Gallo  
Prof. Dr. D. Luis Rivera de los Arcos Prof.<sup>a</sup> Dra.  
D<sup>a</sup>. Juana Benedí González  
Prof.<sup>a</sup> Dra. D<sup>a</sup> Emilia Barcia Hernández

1. **Emisión del informe sobre la utilización del Animalario de la SD. De Fisiología para llevar a cabo el Proyecto "Identificación de nuevos factores modulares de inflamasoma en las células beta pancreáticas. Comunicación intertisular intestino-páncreas" de la Profa. Elisa Fernández Millán.**

La Sra. Decana ha remitido a los miembros de la Comisión la documentación aportada por la Profesora Elisa Fernández Millán solicitando el informe sobre la utilización del Animalario (se adjunta documentación)

Se ha recibido respuesta de los nueve miembros de la Comisión, todas ellas favorables, por lo que se aprueba por unanimidad la emisión del informe para la utilización del animalario.

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>  
La Decana

El Secretario Académico

Fdo. Irene Iglesias Peinado

Fdo. Jesús Román Zaragoza

	<b>COMITÉ DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b> Solicitud de Evaluación y Memoria de Contenidos de Proyecto (RD 53/2013, Experimentación Animal)  <b>F01-PROYECTOS</b>	<b>Servicio de Investigación</b> GEISER: Unidad Tramitadora U01000294
--	--	---

<b>Investigador Principal Proyecto</b>	Nombre: ELISA FERNÁNDEZ MILLÁN DNI: 50975486-B		
	Centro: FACULTAD DE FARMACIA	Departamento/ Sección: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	
	Teléfono: 913941857	Correo electrónico: elfernan@ucm.es	
<b>Investigador Responsable Procedimientos</b>	Nombre: FERNANDO ESCRIVÁ PONS DNI: 19974858-W		
	Centro: FACULTAD DE FARMACIA	Departamento/ Sección: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	
	Teléfono: 913941857	Correo electrónico: fescriva@ucm.es	
<b>Título del Proyecto</b>	Título: Identificación de nuevos factores moduladores del inflammasoma en las células $\beta$ pancreáticas. Comunicación intertisular intestino-páncreas.		
	Fecha de inicio: 01/09/2021	Fecha de finalización: 31/08/2024	
<b>Finalidad del Informe</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Científica <input type="checkbox"/> Docente <input type="checkbox"/> Imposición legal		
	Presentación de proyecto para ser financiado Organismo:      Convocatoria: Ministerio de Ciencia e Innovación      2020		
	Proyecto financiado en ejecución Organismo:      Referencia:		
	Autorización de experimentación o actividad		
	Otros (especificar):		

Fecha y Firma

Vº.Bº. Vicerrectora de Investigación y Transferencia y Responsable administrativo de usuario	Investigador/a Principal
Dña. Margarita San Andrés Moya	D./Dña. ELISA FERNÁNDEZ MILLÁN (Al firmar declaro haber leído y aceptado la cláusula de protección de datos al pie indicada)

**Información básica de protección de datos del tratamiento: Investigación**

**Responsable** Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

**Finalidad** Ayudas y acciones para desarrollo de la investigación Científica

**Legitimación** Cumplimiento de una obligación legal; Misión en interés público

**Destinatarios** Se prevén cesiones

**Derechos** Acceder y rectificar los datos, así como otros derechos, explicados en la información adicional

**Infor. adicional** Puede consultarla con detalle en: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/3-2018-05-23-Info-Adic-Tratamiento-Investigación.pdf>

<b>1. DATOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN O PROCEDIMIENTO</b> (se ruega que estos apartados sean lo más breves y concisos posibles)	
<b>Título</b>	Identificación de nuevos factores moduladores del inflamasoma en las células $\beta$ pancreáticas. Comunicación intertisular intestino-páncreas.
<b>Resumen*</b>	El propósito principal del Proyecto es la identificación de las potenciales acciones antiinflamatorias de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en las células beta pancreáticas y la caracterización de los mecanismos moleculares implicados, tanto desde un abordaje in vitro como ex vivo e in vivo.
<b>Objetivos</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Definir el potencial efecto modulador de los SCFAs sobre la cascada de activación del inflamasoma NLRP3 en un modelo in vitro de inflamación de células beta pancreáticas.</li> <li>Analizar in vivo el efecto de los SCFAs en la modulación del inflamasoma NLRP3 en las células beta de islotes pancreáticos: usaremos un modelo animal de síndrome metabólico asociado a catch-up growth caracterizado por presentar inflamación intra-islote y disfunción de células beta, además de disbiosis intestinal y endotoxemia metabólica tempranas.</li> </ol>
<b>Importancia de la Investigación</b>	Explicar los beneficios científicos de este trabajo en el avance del conocimiento, o en el bien para la sociedad: El envejecimiento poblacional y estilo de vida occidental contribuyen a establecer un contexto inflamatorio, fundamental en la patofisiología de la diabetes tipo 2 (T2D). En este, y en otros desórdenes metabólicos, ha sido descrita una desregulación del inflamasoma que promueve una excesiva inflamación propia de estas patologías. Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), productos de la fermentación de la fibra por las bacterias intestinales, y las catelicidinas, péptidos de defensa antimicrobianos, modulan el inflamasoma en ciertos tipos celulares pero su papel en célula beta pancreática y su relevancia clínica en la T2D aún no ha sido bien establecida. En este sentido, la identificación de nuevos moduladores del inflamasoma en las células beta pancreáticas contribuirá al diseño de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a amortiguar dicha inflamación.
<b>Análisis previsto de los resultados</b>	<p>Variable(s) que se va(n) a medir y unidad(es) de medida:</p> <p><b>OBJETIVO 1:</b> Gran parte de este objetivo se va a realizar en la línea celular de insulinoma de rata INS-1E. Sin embargo, determinadas variables deberán ser testadas también en un modelo ex vivo más fisiológico de islotes de Langerhans de rata Wistar aislados y cultivados. Para el análisis ex vivo/in vitro de los mecanismos de modulación del inflamasoma NLRP3 en células beta pancreáticas las variables son: expresión génica (expresión relativa o RQ) o niveles de expresión proteica (densitometría, unidades arbitrarias) de elementos de la cascada de señalización del inflamasoma; actividad de la caspasa-1 (emisión de fluorescencia); producción de citoquinas (<math>\mu\text{g/ml}</math>); localización por microscopía de fluorescencia de elementos del inflamasoma (cualitativo).</p> <p><b>OBJETIVO 2:</b> Análisis in vivo de la modulación del inflamasoma NLRP3 en células beta pancreáticas: test de tolerancia a la glucosa (mg/dl) e insulina (ng/ml); niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias (pmol/L) y ácidos grasos de cadena corta (<math>\mu\text{M}</math>); caracterización del fenotipo de macrófagos infiltrados en los islotes pancreáticos (valores porcentuales relativos de subpoblaciones celulares respecto a poblaciones de células inmunes más generales), localización por microscopía de fluorescencia de elementos del inflamasoma (cualitativo), masa de células beta (% área ocupada por las células beta/área total del tejido), replicación células beta (% células Ki67+/total de células); expresión génica (expresión</p>

relativa o RQ) o niveles de expresión proteica (densitometría, unidades arbitrarias) de elementos de la cascada de señalización del inflamasoma.

Factor(es) que se va(n) a estudiar y niveles (tratamientos) de cada factor:

**OBJETIVO 1:**

En los estudios in vitro, puntualmente se usarán islotes de Langerhans aislados de ratas Wistar adultas mantenidas en condiciones estándar de alimentación. Sobre estos islotes se aplicarán distintos tratamientos farmacológicos (lipopolisacáridos, ATP o ácidos grasos de cadena corta...).

**OBJETIVO 2:** Sobre los animales, los factores a tener en cuenta son:

**A) Dieta:** El trabajo que se propone en este Proyecto se centrará en un modelo de experimentación en rata Wistar hembras donde los animales son manipulados nutricionalmente con distintas pautas de alimentación y que ha sido previamente validado (de Toro-Martín et al. Endocrinology 2014; Martínez-Oca et al. J Nutr Biochem 2020). Brevemente, las ratas gestantes serán sometidas o no a restricción nutricional del 65% sobre una dieta estándar (SAFE A04) desde el último tercio de la gestación y durante la lactancia. Las crías una vez destetadas se someterán a una dieta obesogénica con un alto contenido en grasa (High Fat Diet 45% D12451, Research Diets). Por tanto se dispondrá de 4 poblaciones de 25 semanas de vida (aprox. 6 meses):

- 1)Ratas controles (C) : alimentadas ad libitum toda la vida.
- 2)Ratas subnutridas (S): restricción del 65% de la ingesta diaria de alimento hasta el sacrificio.
- 3)Ratas controles realimentadas con dieta alta en grasa 22 semanas desde el destete (CHF).
- 4)Ratas subnutridas realimentadas con dieta grasa 22 semanas desde el destete (SHF).

A lo largo de todo el estudio los animales son distribuidos aleatoriamente para recibir los distintos tipos de dieta.

**B) Tratamiento con acetato:** El acetato sódico (Sigma-Aldrich) se administrará a un grupo de animales CHF y SHF disuelto en el agua de bebida previamente esterilizada (dosificación: 100 y 300 mM) y como ha sido descrito anteriormente (Macia L. et al. Nat Commun. 6:6734, 2015). El tratamiento durará 3 semanas, desde la semana 22 hasta la semana 25 de vida (renovando el agua de bebida por preparados frescos 3 veces por semana). Las ratas permanecerán con dieta alta en grasa durante todo el tiempo de tratamiento con acetato.

La distribución de los animales dentro de los distintos grupos experimentales se realizará de forma aleatoria.

**Modelo(s) estadístico(s) o metodología(s):** Se realizará la comparación de medias entre los tratamientos aplicados a los islotes aislados (descritos en los objetivos 1) o entre las distintas intervenciones nutricionales aplicadas a los animales, seguidas o no de tratamiento con acetato (objetivo 2) a través del Análisis de la Varianza (ANOVA) de una o dos vías según proceda.

Este estudio sigue el diseño experimental y modelo estadístico empleado anteriormente por los miembros del equipo y que se ha plasmado en numerosas publicaciones científicas en revistas de primer orden a algunas de las cuales se hace referencia en la memoria.

(Ejemplo: modelo unifactorial, bifactorial, con bloques, regresión, etc. o comparaciones entre grupos indicando el tipo de test que se realizará, análisis de la varianza de una vía, de dos vías, etc.)

**Tipo de proyecto** (Ver art.31 RD 53/2013)

Tipo I

Tipo II

Tipo III

**\*Resumen máximo 300 caracteres**

## 2. DATOS DE LOS PARTICIPANTES

Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

Cargo o Puesto	Capacitación categorías/funciones según RD 53/2013 y Orden ECC/566/2015 / en trámite*	Nombre	Centro
Investigador principal del proyecto	C y B	Elisa Fernández Millán	Farmacia
Investigador responsable del diseño de los proyectos y procedimientos	C y B	Fernando Pons Escrivá	Farmacia
Miembro del equipo investigador			
Miembro del equipo investigador			
Miembro del equipo investigador			
Miembro del equipo investigador			
Miembro del equipo investigador			
Miembro del equipo investigador			
Miembro del equipo de trabajo	C y B	Carmen Álvarez Escolá	Farmacia
Miembro del equipo de trabajo	B	Tamara Fernández Marcelo	Otras entidades de investigación
Miembro del equipo de trabajo	B	Paula Martínez Oca	Farmacia

\* Grupo de Categoría según RD 53/2013. (E.t.): Si está en trámite (e.t.), indíquese la persona que supervisa la realización del procedimiento. Cumplimentación obligatoria en todos los miembros.

### Observaciones punto 2.

Las capacitaciones de los investigadores son:

- Según Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre:

**Categoría A:** personal para el cuidado de los animales.

**Categoría B:** personal que lleva a cabo los procedimientos.

**Categoría C:** personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos.

**Categoría D:** personal especialista en ciencias del animal de experimentación con funciones de asesoramiento sobre el bienestar de los animales:

**Categoría D1.** Personal especialista en bienestar animal: persona con titulación universitaria superior en el área de Ciencias de la Salud, encargada de supervisar y asesorar todos los aspectos relacionados con el bienestar de los animales.

**Categoría D2.** Personal especialista en salud animal: persona licenciada en Veterinaria con formación complementaria especializada en animales de experimentación, encargada de supervisar y asesorar todos los aspectos relacionados con la salud de los animales.

- Según la Orden ECC 566/2015, de 20 de marzo:

**Función a:** Cuidado de los animales.

**Función b:** Eutanasia de los animales.

**Función c:** Realización de los procedimientos.

**Función d:** Diseño de los proyectos y procedimientos.

**Función e:** Asunción de la responsabilidad de la supervisión «in situ» del bienestar y cuidado de los animales.

**Función f:** Asunción de las funciones de veterinario designado.

- Equivalencias:

Categoría A: función a y b / Categoría B: función b y c / Categoría C: función c y d/ Categoría D1: función e /Categoría D2: función f y b

### 3. DATOS DE LOS ANIMALES (incluidos los modificados genéticamente)

Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

#### Descripción y número de animales por cada grupo (incluido/s el/los grupo/s de control)

Experi- mento	Especie	Raza/estirpe/línea	Sexo	Edad (d,m,a)	Peso	Procedencia	Nº por Grupo	Nº Grupos	Nº Total
1	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar	H	3m		Janvier Labs	10	1	10
2	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (gestante)	H	3m		Janvier Labs	13	1	13
3	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar	H	6m		Janvier Labs	4	4	16
4	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar	H	6m		Janvier Labs	8	6	48
5	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar	H	6m		Janvier Labs	8	4	32
6	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar	H	6m		Janvier Labs	4	4	16
7									
8									
9									
10									

**Si la procedencia de los animales es de origen externo, indicar el medio de transporte** (Laboratorio de procedencia, empresa suministradora/empresa transporte/traslado por parte del investigador)

Janvier Labs (Francia). Transporte por carretera.  
CS 4105 LE GENEST ST ISLE  
53941 SAINT BERTHEVIN CEDEX France

#### Centro de estabulación

Nombre y código de registro:

- Instalaciones reglamentadas que el CAI (Animalario de la Universidad Complutense) tiene en las Facultades de Biología, Psicología y Medicina (Nº de Registro: ES-28079-0000086)
- Instalaciones de animalarios oficialmente autorizados y registrados en la UCM  
Nombre y Centro : Animalario S.D. de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de la UCM  
Nº de Registro: ES280790000085

	<input type="checkbox"/> Otras instalaciones expresamente diseñadas para la estabulación de animales de experimentación. - Departamento o Laboratorio responsable: - Condiciones y mecanismos de control ambiental de los que dispone temperatura, fotoperiodo, humedad, renovación aire, filtros, limpieza): - Motivos que justifiquen la necesidad de manipular los animales en estas instalaciones:  <input type="checkbox"/> Condiciones y cuidado de los animales no estabulados (animales con propietario):
--	--

### Observaciones punto 3.

**Descripción y número de animales por grupo:**

Edad (d, m, a): Escribir d por "días", m por "meses" y a por "años".

Nº por grupos.: Es el número de animales (de cada grupo) por cada experimento.

Nº grupos. Es el número de experimentos que se realizará con cada grupo.

Nº Total. El número total de animales por cada grupo.

### 4. DATOS DEL PROCEDIMIENTO ANIMAL \*

Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

<b>Título del proyecto:</b> Identificación de nuevos factores moduladores del inflammasoma en las células $\beta$ pancreáticas. Comunicación intertisular intestino-páncreas.	<b>Duración/ Frecuencia</b>
<input checked="" type="checkbox"/> Adscripción a un Procedimiento autorizado Referencia, PROEX: Modelo animal de restricción nutricional y posterior realimentación (BFU2016-77931-R), PROEX 349/15. (Adjuntar copia)	
<input checked="" type="checkbox"/> Breve descripción de cada procedimiento (P) que se realiza en el Proyecto, indicando brevemente, <b>en orden cronológico</b> , la cadena de actuaciones con el animal, así como la duración y frecuencia de cada uno:	<u>Duración (tiempo que se estima para realizar el procedimiento) / Frecuencia (número de veces que se realiza dicho procedimiento).</u>
P1 Ayuno nocturno para preparación del animal antes de la realización del test de tolerancia oral a la glucosa: se retira la comida la tarde anterior a la prueba dejándose ad libitum el agua de bebida.	Duración/frecuencia P1: 16 h de ayuno/1 vez
P2 Prueba de tolerancia a la glucosa oral (oGTT): se realiza en los animales anteriormente ayunados (P1) y totalmente conscientes. Se administrará a los animales con sonda oral 2g/kg de peso corporal de glucosa.	Duración/frecuencia P2: 3 min sonda oral/rata./1 vez
P3 Recogida de muestras de sangre (< 100 $\mu$ l) tras la administración de la sobrecarga oral de glucosa indicada en el P2: la sangre se recoge de la vena caudal, practicando una pequeña incisión bajo anestesia leve con isoflurano, a distintos tiempos tras la administración de glucosa (0, 15, 30, 60 y 120 min), analizándose la concentración de glucosa con un glucómetro compacto AccuCheck (Roche).	Duración/frecuencia P3: 2 h hasta recogida total de todas las muestras/1 vez
P4 Prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal (ipITT): se utilizarán animales en periodo postprandial que se inyectarán intraperitonealmente con insulina soluble a 1 UI/kg de peso corporal. Las variaciones de glucosa en sangre se medirán en cada muestra después de 0, 15, 30, 45 y 60 minutos usando sangre de la vena caudal (< 100 $\mu$ l) y un glucómetro como se ha indicado antes.	Duración/frecuencia P4: 1 min inyección/rata + 1h espera hasta recogida total sangre./1 vez
P5 Tratamiento con acetato: El acetato sódico (Sigma-Aldrich) se administrará a los animales disuelto en el agua de bebida previamente esterilizada como ha sido descrito anteriormente (Macia L. et al. Nat Commun. 6:6734, 2015).	Duración/frecuencia P5: 3 semanas/1 vez

El tratamiento durará 3 semanas, desde la semana 22 hasta la semana 25 de vida (renovando el agua de bebida por preparados frescos 3 veces por semana). Procedimiento no invasivo que no se espera cause molestia o sufrimiento a los animales más allá de la monitorización de ganancia/pérdida de peso e ingesta.		
P6		Duración/frecuencia P6:
P7		Duración/frecuencia P7:
P8		Duración/frecuencia P8:
P9		Duración/frecuencia P9:
P10		Duración/frecuencia P10:
P :		Duración/frecuencia :

### Severidad esperada del procedimiento (ver anexo I)

Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

Procedimiento	Leve	Moderado	Severo	Sin recuperación
P1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### Severidad global esperada de los procedimientos

Severidad global	Leve	Moderado	Severo	Sin recuperación
Según el investigador responsable de los procedimientos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### METODOLOGÍA

Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

#### Administración/Inoculación

	Vía	CANTIDAD (volumen, peso, etc)	Frecuencia	Intervalo
--	-----	-------------------------------------	------------	-----------

	<b>COMITÉ DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b> Solicitud de Evaluación y Memoria de Contenidos de Proyecto (RD 53/2013, Experimentación Animal)	<b>Servicio de Investigación</b> GEISER: Unidad Tramitadora U01000294
	<b>F01-PROYECTOS</b>	

Producto (indicar principio activo cuando sea posible) /			Dosis	Nº de veces	
D-Glucosa (solución acuosa al 40%)	Oral	2g/kg peso	2g/kg peso	1 vez	
Insulina humana para inyección (Actrapid 100 UI/ml; NovoNordisk)	Intraperitoneal	1 UI/kg peso	1 UI/kg peso	1 vez	
Acetato (acetato sódico de Sigma-Aldrich) disuelto en el agua de bebida esterilizada	Oral	Ad libitum	100/300mM	1 vez	3 semanas

Toma de muestras				
Muestra (in vivo)	Vía	CANTIDAD (Volumen, peso, etc.)	Frecuencia (nº de veces e intervalo)	Nº veces Total
Recogida de sangre	Vena caudal	Menos de 100 microlitros	1 x oGTT (0, 15, 30, 60 y 120 min) 1 x ipITT (0, 15, 30, 45 y 60 min)	2/animal

**Procedimientos conductuales**  
 Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

Procedimiento conductual / Test	Breve descripción	Duración	Nº de veces que se realiza / intervalo
No procede			

Ayunos			
Ayunos	Breve descripción (indicar si es parcial o total)	Duración	Nº de veces que se realiza / intervalo
<input type="checkbox"/> Agua			
<input checked="" type="checkbox"/> Comida	Total. Antes de la administración oral de glucosa para el oGTT.	16 h	1 vez

Procedimientos quirúrgicos			
Cirugía: breve descripción de la cirugía a realizar	Anestesia	Analgesia	Duración estimada
No procede	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> Inyectable <input type="checkbox"/> Inhalatoria	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> Previa <input type="checkbox"/> Solo posterior	<input type="checkbox"/> NO

**5. APLICACIÓN DE MÉTODOS PARA REEMPLAZAR, REDUCIR Y REFINAR (3R) EL USO DE ANIMALES EN PROCEDIMIENTOS**  
**Justificación de la necesidad de utilización de animales**

**¿Existe un método alternativo?<sup>1</sup>**

Si se cree que no existen métodos alternativos, explicar cómo ha llegado a esa conclusión. Citar las fuentes consultadas:

En el presente proyecto se propone realizar la caracterización de nuevos moduladores del inflammasoma en célula  $\beta$  pancreáticas desde tres abordajes complementarios: in vitro, ex vivo e in vivo, lo que eventualmente puede llegar a ser de relevancia terapéutica para los pacientes con diabetes de tipo 2. Por ello, y con el fin de minimizar el número de animales, una parte importante de estos experimentos se ha diseñado sobre la línea celular INS-1E secretora de insulina (análisis in vitro, objetivo 1). Sin embargo, debe ser cuidadosamente considerada la complejidad fisiológica del islote pancreático de Langerhans y el hecho fundamental de que el funcionamiento de cada tipo celular dentro del islote (células beta, alfa, delta, PP y epsilon) depende de las células vecinas. Es por ello que determinados resultados obtenidos con la línea INS-1E requerirán ser confirmados en un entorno más fisiológico como son los islotes primarios completos aislados de ratas (análisis ex vivo, objetivo 1).

Finalmente, metabolitos derivados de otros tejidos pueden condicionar el crecimiento, la supervivencia y funcionalidad de los islotes pancreáticos in vivo y favorecer o proteger frente al desarrollo de patologías metabólicas como la obesidad y diabetes tipo 2. Con el fin de estudiar las señales implicadas en la comunicación interisular intestino-páncreas (a través del efecto de los ácidos grasos de cadena corta), el trabajo que se propone en el objetivo 2 se centrará en un modelo de experimentación en rata Wistar donde los animales son manipulados nutricionalmente con distintas pautas de alimentación y que ha sido previamente validado gracias a las numerosas publicaciones derivadas de los resultados obtenidos en él (descrito en el punto 1 de la memoria de contenidos, apartado "análisis previsto de los resultados"). Por lo tanto, el uso de animales de experimentación es indispensable para la consecución del objetivo 2 propuesto en este Proyecto.

Fuentes consultadas:

Alternatives Research & Development Foundation  
<http://www.aavs.org/html/ardf.html>

Alternatives to the use of live vertebrates in Biomedical Research and Testing <http://sis.nlm.nih.gov/altread.cfm>

In Vitro Testing Platform (IVTIP): <http://www.ivtip.org>

Institute for In Vitro Sciences: <http://www.iivs.org>

The Universities Federation for Animal Welfare (UFAW)  
<http://www.users.dircon.co.uk/~ufaw3/>

**Justificar el tamaño de la muestra (animales/grupo) y método estadístico utilizado para ello**

Describe brevemente cada uno de los experimentos que vaya a realizar y el método estadístico propuesto para el análisis (ver NOTAS). Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

Experimento 1:	<p>Ensayos ex vivo/in vitro a partir de islotes de Langerhans aislados de ratas Wistar de 3 meses sin ningún tipo de tratamiento dietético o farmacológico. El rendimiento aproximado de islotes/rata obtenido en nuestro grupo es de 250-300 islotes.</p> <p>8 réplicas independientes por cada condición experimental será el mínimo establecido por criterios estadísticos (técnicas de muestreo para contrastes de hipótesis paramétricos) para alcanzar una muestra representativa que se pueda someter a un análisis tipo ANOVA con garantías de obtener resultados estadísticamente fiables, asumiendo diferencias significativas con SD = 1.8, Alpha = 0.05 y una potencia = 0.8. Para este cálculo se ha utilizado el módulo de estadística descriptiva StatMate del programa GraphPad, de acuerdo con las recomendaciones para el cálculo del tamaño de una muestra de R. A. Parker and N. G. Berman (Sample Size: More than Calculations, Am. Statistician 57:166-170, 2003). Estos criterios se mantendrán en el resto de experimentos a no ser que se indique específicamente otra cosa.</p> <p>Para cada uno de los ensayos in vitro propuestos se realizarán 6 condiciones experimentales a comparar simultáneamente. Los ensayos propuesto son:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Actividad caspasa-1 y liberación de citoquina IL-1b: considerando que se plaquearán un promedio de 20 islotes/pocillo, con 6 condiciones experimentales y 8 replicas para cada condición, el número mínimo de animales requeridos para este estudio es de 8 ratas (20 x 8 x 6 = 960 islotes x 2 ensayos = 2000 islotes aprox) (2000 islotes/250 islotes/rata = 8 ratas).</li> <li>- Caracterización de la expresión constitutiva de la catelicidina CRAMP en islotes de rata por RTqPCR: Este ensayo no implica la comparación con ningún otro grupo experimental, sólo queremos confirmar la expresión génica o no de esta molécula representando el resultado como expresión relativa respecto a un gen endógeno. Se harán 4 réplicas de 100 islotes cada una, total 400 islotes (400/250 islotes por rata = 2 ratas aprox.)</li> </ul>
Experimento 2:	<p>Análisis de la expresión génica de elementos del inflammasoma Nlrp3 por RTqPCR: se necesitan 100 islotes por réplica x 8 réplicas = 800-1000 islotes/grupo animal a comparar simultáneamente (C, U, CHF, UHF).</p> <p>1000 islotes/250 islotes por rata = 4 ratas/grupo x 4 grupos = 16 animales</p>
Experimento 3:	<p>Realización de oGTT e ITT a los animales CHF y SHF tratados o no con acetato a dos dosis (100 y 300 mM) que se compararán simultáneamente. 6 grupos experimentales x 8 animales/grupo</p> <p>Tras recuperarse 2-3 días se sacrificarán los animales anteriores para tomarles muestras de sangre, tisulares e islotes pancreáticos para citometría (300 islotes x réplica x 8 réplicas/grupo = 2400 islotes).</p> <p>Número de animales por grupo = 8 (48 animales, los mismos que para oGTT e ITT)</p>
Experimento 4:	<p>Inmunohistoquímica en páncreas completo (replicación): 8 páncreas/grupo experimental x 4 grupos a comparar simultáneamente (CHF, SHF con o sin acetato a una única dosis 300mM). Número animales = 24</p>

<p>Experimento 5:</p>	<p>Modulación del inflammasoma tras el tratamiento con acetato. Comprende dos ensayos con islotes pancreáticos aislados.</p> <p>Ensayo 1: 30 islotes x réplica x 8 réplicas = 240 islotes/grupo (4 grupos de comparación simulatánea: CHF/CHF-300mM acetato/SHF/SHF-Acetato 300mM). 1 rata por grupo. Número total animales = 4</p> <p>Ensayo 2: 100 islotes/réplica x 8 réplicas = 800 islotes/grupo (4 grupos de comparación simultánea: CHF/CHF-Acetato 300mM/SHF/SHF-Acetato 300mM). 3 ratas por grupo. Número total animales = 12</p>
<p>NOTAS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si el análisis estadístico a realizar en el/los experimento/s propuesto/s es descriptivo o requiere comparaciones o contrastes de hipótesis, ya sea entre dos o más grupos en comparación simultánea, indicar en la Tabla 1 los parámetros a fijar para justificar el tamaño muestral de cada experimento.</li> <li>• Si se emplea otra metodología de análisis estadístico (modelos de regresión, análisis factorial, modelos de supervivencia, etc.), justificar, en cada caso y brevemente, el tamaño muestral estimado</li> </ul>	
<p><b>Estimación del número total de animales del proyecto (incluida la cría de líneas)</b></p>	<p><b>OBJETIVO 1:</b> Para calcular el número de animales a utilizar en el presente objetivo se tendrá en cuenta que los ensayos ex vivo/in vitro se realizarán a partir de islotes de Langerhans aislados de ratas Wistar mantenidas en condiciones estándar (agua y bebida ad libitum, sin ningún tipo de tratamiento). Se realizarán 8 réplicas independientes de cada tratamiento in vitro para cada ensayo con el fin de lograr diferencias significativas con SD = 1.8, Alpha = 0.05 y potencia = 0.8. Para cada uno de los ensayos in vitro propuestos se realizarán 6 condiciones experimentales.</p> <p>El rendimiento aproximado de islotes/rata obtenidos en nuestro grupo dada la amplia experiencia en el aislamiento de islotes pancreáticos es de 250-300. Los ensayos propuestos en este Experimento 1 son: - Actividad caspasa-1 y liberación de citoquina IL-1b: considerando que se plaquearán un promedio de 20 islotes/pocillo, con 6 condiciones experimentales y 8 replicas para cada condición, el número mínimo de animales requeridos para este estudio es de 8 ratas (20 x 8 x 6 = 960 islotes x 2 ensayos = 2000 islotes aprox) (2000 islotes/250 islotes/rata = 8 ratas). - Caracterización de la expresión constitutiva de la catelicidina CRAMP en islotes de rata por RTqPCR: Este ensayo no implica la comparación con ningún otro grupo experimental, sólo queremos confirmar la expresión génica o no de esta molécula representando el resultado como expresión relativa respecto a un gen endógeno. Se harán 4 réplicas de 100 islotes cada una, total 400 islotes (400/250 islotes por rata = 2 ratas aprox.)</p> <p>Total ratas objetivo 1 = 10 ratas Wistar hembras de 3 meses de vida.</p> <p><b>OBJETIVO 2:</b> 13 ratas gestantes que se distribuirán aleatoriamente en las distintas pautas nutricionales según los modelos descritos en el punto 1 de esta solicitud y cuyas crías son las que se usarán al alcanzar los 6 meses de vida para los experimentos que se señalan a continuación (asumiendo camadas de 9-10 crías):</p> <p>4 ratas C para 1 experimento 4 ratas S para 1 experimento 24 ratas CHF para 4 experimentos 24 ratas SHF para 4 experimentos 8 ratas CHF+Acetato (100 mM) para 1 experimento 8 ratas SHF+Acetato (100 mM) para 1 experimento 20 ratas CHF+Acetato (300 mM) para 3 experimentos 20 ratas SHF+Acetato (300 mM) para 3 experimentos</p>

	<p>Para calcular el número de animales a utilizar en el presente objetivo se deben tener en cuenta dos tipos de aproximaciones experimentales. A) Algunos ensayos se realizarán ex vivo a partir de islotes de Langerhans aislados de ratas Wistar de los grupos mencionados arriba. Se asume un rendimiento de 250-300 islotes/rata. Se realizarán 8 réplicas independientes por grupo y para cada ensayo con el fin de lograr diferencias significativas con SD = 1.8, Alpha = 0.05 y potencia = 0.8. Dependiendo del ensayo, cada réplica implica un número distinto de islotes.</p> <p>B) En el otro tipo de aproximaciones experimentales cada animal de cada grupo experimental aportará una única muestra biológica, necesitándose 8 muestras de cada grupo experimental (8 animales) para establecer comparaciones con los otros grupos con el fin de lograr diferencias significativas con SD = 1.8, Alpha = 0.05 y potencia = 0.8.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Experimento 2: Análisis de la expresión génica de elementos del inflammasoma Nlrp3 por RTqPCR: se necesitan 100 islotes por réplica x 8 réplicas = 800-1000 islotes/grupo animal (C, U, CHF, UHF). Número de animales por grupo = 4 (16 animales)</li> <li>- Experimento 3: Realización de oGTT e ITT a los animales CHF y SHF tratados o no con acetato a dos dosis (100 y 300 mM). 6 grupos experimentales x 8 animales/grupo Tras recuperarse 2-3 días se sacrificarán los animales anteriores para tomarles muestras de sangre, tisulares e islotes pancreáticos para citometría (300 islotes x réplica x 8 réplicas/grupo = 2400 islotes). Número de animales por grupo = 8 (48 animales)</li> <li>- Experimento 4: Inmunohistoquímica en páncreas completo (replicación): 8 páncreas/grupo experimental x 4 grupos (CHF, SHF con o sin acetato a una única dosis 300mM). Número animales = 24</li> <li>- Experimento 5: Modulación del inflammasoma tras el tratamiento con acetato. Comprende dos ensayos con islotes pancreáticos aislados. Ensayo 1: 30 islotes x réplica x 8 réplicas = 240 islotes/grupo (4 grupos: CHF/CHF-300mM acetato/SHF/SHF-Acetato 300mM). Número animales = 4 Ensayo 2: 100 islotes/réplica x 8 réplicas = 800 islotes/grupo (4 grupos: CHF/CHF-Acetato 300mM/SHF/SHF-Acetato 300mM). Número animales = 12</li> </ul> <p>Número total ratas del objetivo 2 = 125 ratas.</p> <p>Número total ratas del Proyecto = 148 ratas. Sin embargo, dado que a lo largo del Proyecto puede resultar algún experimento fallido se contemplarán 2 hembras gestantes más con sus 20 crías aproximadas siendo el número total 170 ratas.</p>
<p><b>Justificar la necesidad ausencia de enriquecimiento ambiental</b></p>	<p>En la medida de lo posible se intentará asegurar el enriquecimiento ambiental de tipo social: no se dejará a un único individuo aislado en una jaula sino que estarán alojados en grupos de al menos 4 animales (no más para aquellos animales destinados al estudio nutricional con el fin de asegurar que se cumple la pauta de alimentación proporcional en todos ellos); de tipo físico: proporcionando habitáculos/jaulas con espacio más que suficiente para sus necesidades. No se puede introducir en la jaula estimulación de tipo nutricional debido al tipo de modelo animal que manejaremos.</p>
<p><b>Métodos de Refinamiento para mejorar el bienestar animal<sup>2</sup></b></p>	<p>Justificar las decisiones tomadas: El Proyecto planteado pretende ser, en parte, una continuidad de un Proyecto anterior (BFU 2016-77931-R) donde ya se utilizó el mismo modelo animal de experimentación. En consecuencia, los estudios que se realicen en este Proyecto se basarán en resultados previos del grupo evitando así el tener que realizar determinaciones innecesarias de parámetros ya caracterizados en este modelo animal y, por tanto, disminuyendo el sufrimiento de los mismos.</p>

 <p>UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID</p>	<p><b>COMITÉ DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b> Solicitud de Evaluación y Memoria de Contenidos de Proyecto (RD 53/2013, Experimentación Animal)</p> <p><b>F01-PROYECTOS</b></p>	<p><b>Servicio de Investigación</b> GEISER: Unidad Tramitadora U01000294</p>
--	---	--

	<p>El alojamiento, los cuidados, así como los procedimientos seleccionados en la experimentación se han refinado para eliminar o reducir al mínimo posible el dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero. En cualquier caso, las buenas prácticas de ensayo de animales están garantizadas por el historial del equipo (los miembros del equipo están habilitados en las categorías B y C del RD 53/2013).</p>
<p><b>Medidas para evitar la repetición injustificada de procedimientos</b></p>	<p>Los estudios que se realicen en este Proyecto se basarán en parte en resultados previos del grupo evitando así el tener que realizar determinaciones innecesarias de parámetros ya caracterizados en este modelo animal y, por tanto, disminuyendo el sufrimiento de los mismos. De hecho, hay numerosas muestras biológicas ya recogidas del Proyecto anterior (BFU-2016-77931-R) que serán utilizadas en este Proyecto solicitado. Los únicos procedimientos que se aplicarán de manera repetida serán la recogida de sangre en el oGTT y posteriormente en el ipITT así como el tratamiento subcrónico con acetato en el agua de bebida; procedimientos todos ellos leves pero absolutamente necesarios para la consecución de los objetivos.</p> <p>Al plantear el número de animales necesario para los ensayos ya se ha tenido en cuenta el mínimo tamaño de muestra para evitar repetición innecesaria de procedimientos en un mismo animal.</p>

**Tabla 1. Justificación del tamaño de la muestra en cada experimento y en el total del proyecto  
(Añada tantas filas como necesite, pulsando en + a la derecha en la última línea activa)**

Experi- mento nº	1. Número de grupos que se formarán en el experimento	2. Número máximo de grupos en comparación simultánea (p. e. ANOVA)	3. Nivel de significación del test o de los tests a realizar	4. Potencia requerida del test o de los tests	5. Desviación estándar o típica común*	6. Diferencia mínima a detectar**	7. Proporción prevista de pérdidas en el seguimiento	8. Tipo de test que se va a realizar "unilateral o bilateral"	Número de animales por grupo	Número total de animales
<b>1</b>	6	6	0.05	0.8	1.8			bilateral	no procede	10
<b>2</b>	4	4	0.05	0.8	1.8			bilateral	4	16
<b>3</b>	6	6	0.05	0.8	1.8			bilateral	8	48
<b>4</b>	4	4	0.05	0.8	1.8			bilateral	8	24
<b>5</b>	4	4	0.05	0.8	1.8			bilateral	4	16
Número total estimado de animales necesarios para el proyecto										

\* Si no se conoce, se puede fijar en 1 y en el apartado siguiente expresar la diferencia que se pide en DT

\*\* Indicar la diferencia significativa entre dos grupos, en términos absolutos o en DT (si se trata de proporciones, expresar esta diferencia en puntos porcentuales)

### Observaciones punto 5.

1.- ¿Existe método alternativo?: En este apartado debe indicar las páginas Web relativas a métodos alternativos que ha consultado. Las publicaciones o justificación del proyecto, no son fuentes de métodos alternativos. Puede consultar en la Web de la UCM el enlace a recursos web de métodos alternativos que le pueden servir de ayuda <https://www.ucm.es/reuniones-del-comite>

2.- Refinamiento de los procedimientos: reducción del número de animales utilizados y reemplazamiento por otros animales o métodos que no utilicen animales vivos. Indicar las medidas empleadas para mejorar el bienestar animal y reducir posibles situaciones de estrés y/o malestar, incluyendo el empleo de anestesia y/o analgesia

**6. MEDIDAS CORRECTORAS PARA REDUCIR EL DOLOR, EVITAR Y ALIVIAR CUALQUIER FORMA DE SUFRIMIENTO DE LOS ANIMALES A LO LARGO DE TODA SU VIDA, CUANDO PROCEDA**

Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

Analgésicos (principio activo / Nombre comercial, concentración)	Dosis, Vía	Frecuencia	
		Nº de veces	Intervalo
Anestésicos (principio activo / Nombre comercial, concentración)	Dosis, Vía	Frecuencia	
		Nº de veces	Intervalo
Isoflurano	Inducción 3% y mantenimiento 1,5-2,5%. Inhalado.	Tantas veces como sea necesario durante la realización de los GTT/ITT	

**7. USO DE PUNTOS FINALES HUMANITARIOS**

**Destino final de los animales**

<input type="checkbox"/> Recuperación	<input checked="" type="checkbox"/> <b>Sacrificio. Método (actuación, medicamento / concentración principio activo, vía, dosis, intervalo de dosis, duración etc.) y nombre de la persona responsable de la eutanasia:</b> Decapitación sin anestesia (dada la necesidad de recuperar tejidos y muestras sanguíneas libres de contaminantes químicos). La persona responsable será la Dra. Elisa Fernández Millán.
<input type="checkbox"/> Reutilización	

**Si no se realiza la eutanasia, actuación para reducir el sufrimiento a lo largo del resto de su vida:**

**Criterios de punto final humanitario o de finalización anticipada del estudio o de la eutanasia anticipada del animal\***

Explicar detalladamente el criterio para su aplicación: En el caso de la administración de sustancias por vía oral con sonda gástrica (oGTT) se produjese la entrada de la sustancia a la vía respiratoria se eutanizará al animal. No obstante, dada la experiencia del equipo investigador en la realización de este procedimiento no se ha dado nunca el caso de tener que proceder a eutanasia para evitar dolor y sufrimiento y la recuperación del animal tras el oGTT es prácticamente inmediata.

Enlace a página Web INFORMATIVA sobre punto final humanitario <https://www.humane-endpoints.info/es>

**8. DATOS DE LAS MODIFICACIONES GENÉTICAS (si procede)**

Si necesita más líneas, puede añadir las pulsando + a la derecha de la última línea activa

Nombre de la línea modificada	Modificación / Fenotipo/genotipo *	Severidad

Cualquier línea añadida con posterioridad en el proyecto será clasificada como severa hasta que no se verifique la ausencia de malestar, dolor o sufrimiento en los animales durante el primer año de vida o hasta que no se caracterice y valore la severidad real del fenotipo generado"

\* Modificación/Fenotipo: Especificar la modificación, el fenotipo a que da lugar.

**9. CONDICIONES DE ALOJAMIENTO, ZOOTÉCNICAS Y DE CUIDADO DE LOS ANIMALES**

 <p>UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID</p>	<p><b>COMITÉ DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b> Solicitud de Evaluación y Memoria de Contenidos de Proyecto (RD 53/2013, Experimentación Animal)</p> <p>F01-PROYECTOS</p>	<p><b>Servicio de Investigación</b> GEISER: Unidad Tramitadora U01000294</p>
--	--	--

## Estabulación

<b>Aislamiento (si/no)</b>	<b>Si se aísla (duración y justificación)</b>		
NO			
<b>Método físico de contención (jaula metabólica, cepo de sujeción...)</b>	<b>Duración</b>	<b>Justificación</b>	
NO			
<b>Especificar los requerimientos particulares de manejo (si los hubiera para los animales de este ensayo)</b>			
<b>Problemas conocidos relacionados con la reproducción y cría de cualquier especie, raza, estirpe o línea que se vaya a utilizar en el proyecto</b>			
NO			
<b>Requiere el presente proyecto la modificación de cualquier parámetro medioambiental del animal</b>			
NO			
<b>Protocolo de supervisión de los animales (diario, semanal, mensual, momento crítico...)</b>			
Diario para controlar la ingesta de alimento y/o tratamiento con ácidos grasos de cadena corta.			

## Observaciones punto 9

Si es necesario el aislamiento en jaula metabólica /otros métodos hay que justificarlo e indicar medidas paliativas del estrés que esto supone y debería considerarse otro procedimiento e incluirlo en ese apartado y describir el tipo de severidad. Consultar ANEXO IX

## EVALUACIÓN RETROSPECTIVA

El proyecto será sometido a una evaluación retrospectiva si:

- Utiliza Primates.
- Se incluyen procedimientos clasificados como "severos".
- La realización de procedimientos que conlleven dolor, sufrimiento o angustia severos para los animales y sea probable que dichos efectos sean prolongados y no puedan ser aliviados, cuando por razones excepcionales y científicamente fundadas, se considere necesaria dicha realización.
- Si es solicitado por el Comité de ética.

El plazo de presentación de la evaluación retrospectiva será notificado junto con el Informe Favorable donde se evaluará:

- Si se han alcanzado los objetivos del proyecto.
- El daño infringido a los animales, incluidos el número y las especies de animales utilizados, y la severidad de los procedimientos;
- Cualquiera de los elementos que puedan contribuir a una mejor aplicación del requisito de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento).

 <p>UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID</p>	<p><b>COMITÉ DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b> Solicitud de Evaluación y Memoria de Contenidos de Proyecto (RD 53/2013, Experimentación Animal)</p> <p><b>F01-PROYECTOS</b></p>	<p><b>Servicio de Investigación</b> GEISER: Unidad Tramitadora U01000294</p>
--	---	--

## ANEXO I

### Clasificación de la severidad de los procedimientos

La severidad de un procedimiento se determinará por el grado de dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongado que se prevé que pueda experimentar un animal de forma individual durante el procedimiento.

#### Sección I: Categorías de severidad.

**Sin recuperación**: los procedimientos que se realizan en su totalidad bajo anestesia general de la cual el animal no recupera la consciencia, deben clasificarse como "sin recuperación".

**Leve**: los procedimientos a consecuencia de los cuales los animales es probable que experimenten dolor, sufrimiento o angustia leves de corta duración, así como los procedimientos sin alteración significativa del bienestar o del estado general de los animales, deben clasificarse como "leves".

**Moderado**: los procedimientos a consecuencia de los cuales es probable que los animales experimenten dolor, sufrimiento o angustia moderados de corta duración, o leves pero duraderos, así como los procedimientos que pudieran causar una alteración moderada del bienestar o del estado general de los animales, deben clasificarse como "moderados".

**Severo**: los procedimientos a consecuencia de los cuales es probable que los animales experimenten dolor, sufrimiento o angustia intensos o moderados pero prolongados, así como los procedimientos que pudieran causar una alteración grave del bienestar o del estado general de los animales, deben clasificarse como "severos".

#### Sección II: Criterios de clasificación.

La clasificación de la categoría de severidad tendrá en cuenta cualquier intervención o manipulación de un animal en un procedimiento determinado. Se basará en el efecto más severo que pueda experimentar un animal después de aplicar todas las técnicas apropiadas de refinamiento.

En la asignación a un procedimiento de una categoría particular se han de tener en cuenta el tipo de procedimiento y otros muchos factores, los cuales habrán de considerarse caso por caso.

Los factores relativos al procedimiento deben incluir:

- Tipos de manipulación y manejo;
- Naturaleza del dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongado causados por todos los elementos del procedimiento, así como su intensidad, duración, frecuencia y la multiplicidad de técnicas empleadas;
- Sufrimiento acumulativo en el procedimiento;
- Impedimento de expresar el comportamiento natural, incluidas las restricciones en los estándares de alojamiento, zootécnicos y de cuidado de los animales.

En la sección III se establecen tipos de procedimientos atribuidos a cada categoría de severidad sobre la base de los factores relativos al tipo de procedimiento de que se trate. Facilitarán la primera indicación sobre la clasificación que sería la más adecuada para un determinado tipo de procedimiento.

Sin embargo, a efectos de la clasificación final de severidad de los procedimientos, se han de tener en cuenta los siguientes factores adicionales, valorados caso por caso:

- Tipo de especie y genotipo;
- Madurez, edad y sexo del animal;
- Grado de aprendizaje del animal para el procedimiento;
- Si se reutiliza el animal, la severidad real de los procedimientos anteriores;
- Métodos utilizados para reducir o suprimir el dolor, el sufrimiento y la angustia, incluidos el refinamiento de las condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales;
- Uso de puntos finales humanitarios.

#### Sección III: Tipos de procedimiento atribuidos a cada categoría de severidad sobre la base de los factores relativos al tipo de procedimiento.

##### 1. **Leve**:

- a) Administración de anestesia, salvo para el único propósito de eutanasia:

- b) Estudio farmacocinético donde se administra una única dosis y se recoge un número limitado de muestras de sangre (totalizando < 10 por cien del volumen circulante) y no se prevé que la sustancia cause ningún efecto nocivo detectable;
- c) Técnicas no invasivas de diagnóstico por imagen en animales (por ejemplo resonancia magnética) con la sedación o la anestesia apropiada;
- d) Procedimientos superficiales, por ejemplo biopsias de oreja y rabo, implantación subcutánea no quirúrgica de minibombas y transpondedores;
- e) Aplicación de dispositivos exteriores de telemetría que únicamente causan al animal un debilitamiento menor o una interferencia menor con la actividad y el comportamiento normales;
- f) Administración de sustancia por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, por sonda gástrica e intravenosa a través de los vasos sanguíneos superficiales, donde la sustancia solo tiene un efecto leve en el animal, y los volúmenes se encuentran dentro de límites apropiados para el tamaño y la especie del animal;
- g) Inducción de tumores, o tumores espontáneos, que no causan ningún efecto nocivo clínico perceptible (por ejemplo nódulos pequeños, subcutáneos, no invasivos);
- h) Cría de animales genéticamente modificados que se prevé que dé lugar a un fenotipo con efectos leves;
- i) Alimentación con dietas modificadas, que no cubren las necesidades nutricionales de todos los animales y se prevé que causen una anomalía clínica leve en el periodo de estudio;
- j) Confinamiento a corto plazo (< 24 h) en jaulas metabólicas;
- k) Estudios que implican la privación a corto plazo de compañeros sociales, enjaulado solitario a corto plazo de ratas o ratones adultos de estirpes gregarias;
- l) Modelos que exponen al animal a estímulos nocivos que se asocian brevemente con dolor, sufrimiento o angustia leve, y que el animal puede evitar;
- m) Una combinación o una acumulación de los siguientes ejemplos puede dar lugar a una clasificación leve:
  - 1º. Evaluación de la composición corporal a través de mediciones no invasivas y restricción mínima;
  - 2º. Supervisión ECG con técnicas no invasivas con una restricción mínima o nula de animales habituados;
  - 3º. Aplicación de dispositivos exteriores de telemetría que no se prevé que causen ningún impedimento a animales socialmente adaptados y que no interfieren con la actividad y el comportamiento normales;
  - 4º. Cría de animales genéticamente modificados que no se espera que tengan ningún fenotipo adverso clínicamente perceptible;
  - 5º. Adición a la dieta de marcadores inertes para seguir el paso de la ingesta;
  - 6º. Retirada de la alimentación durante un periodo inferior a 24h en ratas adultas;
  - 7º. Ensayos en campo abierto.

## 2. **Moderado:**

- a) Aplicación frecuente de sustancias de prueba que producen efectos clínicos moderados, y extracción de muestras de sangre (> 10 por cien de volumen circundante) en un animal consciente en el plazo de algunos días sin sustitución del volumen;
- b) Estudios de determinación de la gama de dosis causante de toxicidad aguda, pruebas de toxicidad crónica/carcinogenicidad, con puntos finales no letales;
- c) Cirugía bajo anestesia general y analgesia apropiada, asociada con dolor o sufrimiento posquirúrgicos o alteración posquirúrgica de la condición general. Los ejemplos incluyen: toracotomía, craneotomía, laparotomía u orquidectomía, linfadenectomía, tiroidectomía, cirugía ortopédica con estabilización efectiva y cuidado de heridas, trasplante de órganos con tratamiento efectivo del rechazo, implantación quirúrgica de catéteres, o dispositivos biomédicos (por ejemplo transmisores de telemetría, minibombas, etc.);
- d) Modelos de inducción de tumores, o tumores espontáneos, que se prevé que causen dolor o angustia moderados o interferencia moderada con el comportamiento normal;

- e) Irradiación o quimioterapia con una dosis subletal, o con una dosis que de otro modo sería letal, pero con reconstitución del sistema inmunitario. Cabría esperar que los efectos nocivos fueran leves o moderados y que fueran efímeros (< 5 días);
- f) Cría de animales genéticamente modificados que se espera den lugar a un fenotipo con efectos moderados;
- g) Producción de animales genéticamente modificados mediante procedimientos quirúrgicos;
- h) Uso de jaulas metabólicas que impliquen una restricción moderada de movimientos durante un periodo prolongado (hasta 5 días);
- i) Estudios con dietas modificadas que no cubren las necesidades nutricionales de todos los animales y que se espera que causen una anomalía clínica moderada en el periodo de estudio;
- j) Retirada de la alimentación durante 48 horas en ratas adultas;
- k) Provocación de reacciones de escape y evitación cuando el animal no pueda escapar o evitar el estímulo, y que se espera que dé lugar a una angustia moderada.

### 3. **Severo:**

- a) Ensayos de toxicidad en los que la muerte sea el punto final, o en los que se prevean muertes y se causen estados fisiopatológicos intensos. Por ejemplo, ensayo de toxicidad aguda de dosis única (véanse las directrices de la OCDE sobre ensayos);
- b) Ensayos de dispositivos en los que el fracaso pueda causar dolor o angustia severos o la muerte del animal (por ejemplo dispositivos de reanimación cardiaca);
- c) Ensayo de potencia de una vacuna caracterizada por la alteración persistente del estado del animal, enfermedad progresiva que causa la muerte, asociada con dolor, angustia o sufrimiento moderado prolongado;
- d) Irradiación o quimioterapia con una dosis letal sin reconstitución del sistema inmunitario, o reconstitución con la producción de enfermedad de injerto contra huésped;
- e) Modelos con inducción de tumores, o con tumores espontáneos, que se espera causen enfermedad mortal progresiva asociada con dolor, angustia o sufrimiento moderado duradero. Por ejemplo tumores que causan caquexia, tumores óseos invasivos, tumores que dan lugar a diseminación metastásica, y tumores que se permite que se ulceren;
- f) Intervenciones quirúrgicas y otras en animales bajo anestesia general que se espera den lugar a dolor, sufrimiento o angustia postoperatorios moderados severos o persistentes, o a una alteración severa y persistente de la condición general del animal. Producción de fracturas inestables, toracotomía sin analgesia adecuada, o traumatismo para producir el fallo multiorgánico;
- g) Trasplante de órgano donde es probable que el rechazo del órgano origine angustia o la alteración severa del estado general del animal (por ejemplo xenotrasplante);
- h) Reproducción de animales con trastornos genéticos que se espera experimenten una alteración severa y persistente de su estado general, por ejemplo la enfermedad de Huntington, distrofia muscular, modelos de neuritis crónicas recurrentes;
- i) Uso de jaulas metabólicas que impliquen una restricción severa de los movimientos durante un periodo prolongado;
- j) Choque eléctrico ineludible (por ejemplo para producir invalidez inducida);
- k) Aislamiento completo durante periodos prolongados de especies gregarias, por ejemplo perros y primates;
- l) Tensión de inmovilización para inducir úlceras gástricas o fallo cardiaco en ratas;
- m) Natación forzada o pruebas de ejercicio con el agotamiento como punto final.