

ACTA DE LA REUNIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE FARMACIA, CELEBRADA EL DÍA 8 DE SEPTIEMBRE DE 2015

En la Sala de Juntas “Blanca Feijoo” de la Facultad de Farmacia, siendo las **10:00 horas** del día **8 DE SEPTIEMBRE DE 2015** se reúne el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Facultad, previamente convocado al efecto, bajo la presidencia del Sr. Secretario de la Facultad, el Prof. Dr. D. Jesús Román Zaragoza.

El **Orden del Día** es el siguiente:

- 1. Lectura y aprobación, si procede, del Acta de la Comisión celebrada el pasado 25 de junio de 2015.**
- 2. Informe de los Proyectos presentados por la Prof^a. D^a. Carmen Álvarez Escolá del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II y la Prof^a. Dolores Prieto Ocejo de la Sección Departamental de Fisiología Animal (Se adjunta documentación).**
- 3. Ruegos y preguntas**

ASISTENTES

Prof. Dr. D. Jesús Román Zaragoza
Prof^a. Dra. D^a. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado
Prof^a. Dra. D^a. M^a. Pilar Iniesta Serrano
Prof^a. Dra. D^a. Ana M^a. López Sobaler
Prof^a. Dra. D^a. Concepción Gil García
Prof^a. D^a. Alicia Gómez Barrio
Prof. Dr. D. Albino García Sacristán

Excusan su asistencia el Prof. Dr. D. Rafael Lozano Fernández y la Prof^a. Dra. D^a. Juana Benedí González, quienes expresan por escrito su opinión favorable respecto del acta y del informe a los proyectos.

- 1. Lectura y aprobación, si procede, del Acta de la Comisión celebrada el pasado 25 de junio de 2015.**

Se aprueba el acta por asentimiento.

2. Informe de los Proyectos presentados por la Profª. Dª. Carmen Álvarez Escolá del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II y la Profª. Dolores Prieto Ocejo de la Sección Departamental de Fisiología Animal (Se adjunta documentación).

Una vez estudiada la documentación, previamente enviada a los miembros de la Comisión, aportada por:

- Profª. Dª. CARMEN ÁLVAREZ ESCOLÁ, del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II, sobre: "Papel de la microbiota intestinal en la programación del síndrome metabólico: mecanismos moleculares implicados".

- Profª. Dª. DOLORES PRIETO OCEJO, de la Sección Departamental de Fisiología Animal, sobre: "Disfunción vascular, estrés oxidativo y nefropatía asociada a la obesidad".

Se decide informar favorablemente para que dichos Proyectos de Investigación puedan ser llevados a cabo.

3. Ruegos y preguntas.

No ha lugar.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión siendo las 10:30 horas del día de la fecha de cuyo contenido, que recoge la presente acta, como Secretario, doy fe.

**Madrid, 8 de septiembre de 2015
EL SECRETARIO ACADÉMICO**

Fdo.: Jesús Román Zaragoza

**MEMORIA DE CONTENIDOS (según Anexo X del RD 53/2013:
Elementos a los que se refiere el Art. 33.1)**

INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL PROYECTO

Nombre: CARMEN ÁLVAREZ ESCOLÁ
Facultad: Farmacia Departamento: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II
Campus: UCM Otros
(especificar)
Correo
Teléfono: 913941857 electrónico: calvarez@ucm.es

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN O ACTIVIDAD

Título: PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PROGRAMACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO:
MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS.

FINALIDAD DEL INFORME

Presentación de proyecto para ser financiado
Organismo: Ministerio de Economía y Competitividad

Convocatoria: 2015
Proyectos de I+D+I
"RETOS
INVESTIGACIÓN".
Dirección General de
Investigación Científica y
Técnica Subdirección
General de Proyectos de
Investigación

Proyecto financiado en ejecución
Organismo:

Referencia:

Autorización de actividad de servicio o experimentación con animales (**con cargo Art. 83 u
otra financiación**)

Otros (publicación, informes, etc...). Especificar:

Madrid, a 15/07/2015

Firma: IGNACIO LIZASOAIN HERNÁNDEZ

V.B. VICERRECTOR DE POLÍTICA
CIENTÍFICA, INVESTIGACIÓN Y
DOCTORADO
RESPONSABLE ADMINISTRATIVO DEL
USUARIO

Firma:

INVESTIGADOR PRINCIPAL

1. DATOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN O PROCEDIMIENTO

Título	PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE LA PROGRAMACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO: MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS	Fecha inicio	01/01/2016
		Fecha finalización	31/12/2018
Resumen	<p>La prevalencia del síndrome metabólico que incluye principalmente la obesidad y la diabetes tipo 2, ha experimentado un incremento espectacular durante los últimos años, convirtiéndose en un problema sanitario de extrema gravedad. Ello hace necesario una comprensión profunda de su etiología y patogénesis, con el fin de establecer medidas de prevención e intervención terapéutica eficaces. Se sabe que tanto la carga genética como algunos factores medioambientales contribuyen al desarrollo del síndrome metabólico. Por otra parte, muchos estudios en humanos y animales demuestran que una nutrición materna inadecuada durante el desarrollo perinatal tiene un efecto negativo sobre la programación metabólica de la descendencia; concretamente, esa situación predispone al feto y neonato a padecer enfermedades como la obesidad y la diabetes de tipo 2 a lo largo de la vida. En este contexto, se ha demostrado que la microbiota intestinal (MI) debe ser considerada como un nuevo factor "ambiental" que está implicado en la regulación del metabolismo energético y, por lo tanto, es capaz de influir sobre el desarrollo de la obesidad. La etapa neonatal es clave para la colonización adecuada del tracto gastrointestinal e influye de manera determinante sobre la composición microbiana del individuo adulto. Los cambios cuantitativos y cualitativos de los nutrientes, como los que experimentan los animales sometidos a la pauta de subnutrición-rehabilitación propuesta en el presente Proyecto, pueden repercutir sobre diversos aspectos del tracto gastro-intestinal; entre ellos, de manera relevante, sobre su MI. A su vez, las características de ésta influyen sobre muchos tejidos del organismo, a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, hoy se sabe que la obesidad está asociada a determinados tipos de bacterias intestinales. El Objetivo General de este Proyecto es investigar la influencia que la restricción nutricional materna tiene sobre la MI de la descendencia, en cuanto a su predisposición a experimentar el síndrome metabólico. Concretamente, planeamos estudiar el impacto de ciertos productos generados por la MI sobre algunos tejidos diana que juegan un papel determinante en la aparición de dicho síndrome y en las enfermedades asociadas: el páncreas y el tejido adiposo blanco.</p>		
Objetivos	<p>El OBJETIVO GENERAL de este Proyecto es investigar la influencia que la restricción nutricional materna tiene sobre la MI de la descendencia, en cuanto a su predisposición a experimentar el síndrome metabólico. Concretamente, planeamos estudiar el impacto de ciertos productos generados por la MI sobre algunos tejidos diana que juegan un papel determinante en la aparición de dicho síndrome y en las enfermedades asociadas: el páncreas y el tejido adiposo blanco.</p> <p>En base a esto, los OBJETIVOS ESPECÍFICOS son:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Realizar un estudio longitudinal de la microbiota y función intestinal en ratas sometidas a subnutrición materna y posteriormente realimentadas con dieta grasa. 2.- Papel de los Lipopolisacáridos intestinales sobre la funcionalidad y viabilidad de las células beta pancreáticas. Posible regulación de la expresión y función de la fosfoglicoproteína osteopontina. 3.- Papel de los ácidos grasos de cadena corta producto de la fermentación intestinal sobre la funcionalidad y crecimiento de las células alfa pancreáticas. Posible regulación de la producción de GLP-1. 4.- Estudio de la infiltración de macrófagos y el perfil inflamatorio del tejido adiposo blanco visceral y subcutáneo: relación con el estado nutricional y la microbiota. 		
Importancia de la Investigación	<p>Explicar los beneficios científicos de este trabajo en el avance del conocimiento, o en el bien para la sociedad:</p> <p>La prevalencia de síndrome metabólico (incluyendo principalmente, obesidad y diabetes tipo 2) ha incrementado de manera dramática en los últimos años convirtiéndose en un problema sanitario de gran envergadura. Este hecho hace muy necesario una comprensión más profunda de la etiología y patogénesis de estas enfermedades con el fin de instaurar nuevas medidas de prevención e intervención terapéutica. Se sabe que la carga genética de un individuo pero también la influencia de determinados factores medioambientales pueden contribuir al desarrollo de esta enfermedad. Estudios en humanos y animales (incluyendo los nuestros) demuestran que una nutrición materna inadecuada durante el desarrollo perinatal tiene un efecto negativo sobre la programación metabólica de la descendencia, es decir, predispone al feto y neonato a padecer enfermedades como la diabetes tipo 2 u obesidad a lo largo de su vida. En este contexto, la microbiota intestinal se considera actualmente como un nuevo factor "ambiental" implicado en la regulación del metabolismo energético y la obesidad. El</p>		

	<p>periodo neonatal es crucial para la adecuada colonización del tracto gastrointestinal de los recién nacidos y determina la composición microbiana del individuo adulto. Por todo ello, el estudio que se plantea en este Proyecto puede ser una clave importante para demostrar la relación causal entre la aparición de una disbiosis temprana y el desarrollo de diabetes tipo 2 posterior. En consecuencia, el conocimiento de los mecanismos biológicos y moleculares implicados, podría ayudarnos a diseñar estrategias terapéuticas adecuadas dirigidas a restaurar y mantener la microbiota desde etapas tempranas de la infancia y sobre todo estrategias preventivas dirigidas a asegurar una dieta materna correcta, lo que evitaría posteriores gastos sanitarios. Finalmente, hay que destacar que, a pesar de las diferencias conocidas entre la composición de la microbiota intestinal entre humanos y roedores, los procesos de maduración de la población microbiana son bastante similares entre ellos hecho que confiere gran relevancia a los futuros resultados que se puedan derivar de los estudios propuestos en este Proyecto para los seres humanos.</p>
<p>Análisis previsto de los resultados</p>	<p>Variable(s) que se va(n) a medir y unidad(es) de medida:</p> <p>Factor(es) que se va(n) a estudiar y niveles (tratamientos) de cada factor:</p> <p>Modelo(s) estadístico(s) o metodología(s):</p> <p>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 gracias a las numerosas publicaciones derivadas de los resultados obtenidos en él. Brevemente, las ratas gestantes serán sometidas 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):</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 (CHFD). 4)Ratas subnutridas realimentadas con dieta grasa 22 semanas desde el destete (SHFD). <p>En el objetivo 1 se propone analizar determinados parámetros antes de iniciar la realimentación (3-4 semanas de vida, al destete) y al final de la misma sobre los mismos animales.</p> <p>Por lo tanto, el estudio que se plantea en este Proyecto es MULTIFACTORIAL y LONGITUDINAL. Multifactorial porque los factores a tener en cuenta son: 1) la edad del animal; 2) la dieta y 3) el uso o no de tratamientos farmacológicos (Ej: administración de anticuerpo neutralizante anti-OPN vs. inyección de un vehículo). En los estudios in vitro con islotes aislados habrá que tener en cuenta 1) Tipo de dieta del animal del que proceden, 2) tratamiento (adición de distintos fármacos/sustancias al medio de cultivo). Además, en el diseño experimental hay que tener en cuenta la ALEATORIZACIÓN en la elección de los animales, de modo que, dentro de cada camada se elegirán aleatoriamente los animales para destinarlos a un u otro tipo de realimentación con dieta grasa. De esta manera evitamos hacer un sesgo de las poblaciones y nos aseguramos que todos los grupos de cada tipo de población pertenecen a un mismo estado metabólico. Los estudios in vivo se complementarán con otros realizados in vitro en líneas celulares.</p> <p>Finalmente, los miembros del equipo de investigación están habilitados en las categorías B y C del Real Decreto 1201/2005 y tienen una extensa trayectoria en experimentación animal. Este historial nos capacita para plantear un adecuado número de animales y un exhaustivo análisis estadístico. Por ello, considerando el porcentaje de animales que serán excluidos del ensayo por no cumplir los requerimientos necesarios, el número de muestras se ha reducido</p>

al mínimo posible para poder realizar sobre él un completo análisis estadístico tipo ANOVA de 1 ó 2 vías, según proceda (en los casos específicos que se compare 2 poblaciones/ tratamientos se hará una t-Student: estudios in vitro). 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 ¹

Tipo I

Tipo II

Tipo III

Observaciones evaluador

2. DOCUMENTOS QUE SE ADJUNTAN

- Copia Proyecto Publicaciones, nº:
 Procedimiento animal (publicado o validado)
 Otros (especificar):

Observaciones evaluador

3. DATOS DE LOS PARTICIPANTES

Cargo o Puesto	G.C.*	Nombre	Centro
Investigador principal del proyecto	C y B	CARMEN ÁLVAREZ ESCOLÁ	Farmacia
Investigador responsable del procedimiento	C y B	FERNANDO ESCRIVÁ PONS	Farmacia
Otros investigadores	C y B (e.t.)	ELISA FERNÁNDEZ MILLÁN	Farmacia

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

Observaciones evaluador

4. DATOS DE LOS ANIMALES (incluidos los modificados genéticamente)

Descripción y número de animales por cada grupo (incluidos el grupo(s) control)									
Grupo	Especie	Raza/estirpe/línea	Sexo	Edad ² (d,m,a)	Peso	Procedencia	Nº por Exp ³	Nº Exps ⁴	Nº Total ⁵
A	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (Control)	H	6m		HARLAN LABORATORIES	8	3	24
B	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (Subnutrida)	H	6m		HARLAN LABORATORIES	8	2	16
C	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (CHFD: control high fat diet)	H	6m		HARLAN LABORATORIES	8	3	24
D	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (SHFD: subnutrida high fat diet)	H	6m		HARLAN LABORATORIES	8	2	16
E									0
F									0
G									0
H									0
I									0
J									0

Si la procedencia de los animales es de origen externo, indicar el medio de transporte

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. Fisiología Facultad de Farmacia

Nº de Registro: ES280790000085

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):

	<p>- Motivos que justifiquen la necesidad de manipular los animales en estas instalaciones:</p> <p><input type="checkbox"/> Condiciones y cuidado de los animales no estabulados (animales con propietario):</p>
--	--

<p>Observaciones evaluador</p>

5. DATOS DEL PROCEDIMIENTO ANIMAL ⁶(Procedimiento: La utilización invasiva o no invasiva de un animal para fines experimentales u otros fines científicos, cuyos resultados sean predecibles o impredecibles, o con fines educativos, siempre que dicha utilización pueda causarles un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongado, equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja conforme a la buena práctica veterinaria). Describir cada uno de los Procedimientos que se realizarán dentro del proyecto de Investigación.

Título del proyecto:	Duración ⁷
<input type="checkbox"/> Adscripción a un Procedimiento autorizado ⁸ Referencia:	
<input type="checkbox"/> Nuevo ⁹ . Breve descripción de cada procedimiento (P) que se realiza en el Proyecto, indicando, en su caso, la duración y frecuencia de cada uno ¹⁰ :	
<p>P1 Recogida de heces frescas del día: tanto a los animales de 3-4 semanas de vida como de 25 semanas de vida se les deja defecar de manera espontánea recogiendo inmediatamente las heces frescas. Es un método no invasivo.</p> <p>P2 Administración oral de la sonda fluorescente de 4000Da de isotiocianato de fluoresceína conjugada con dextrano (DX-4000-FITC; Sigma-Aldrich). Dada la necesidad de controlar el tiempo de ingesta y de aparición en sangre se administrará la sustancia (500mg/kg peso) con una sonda gástrica a los animales tras 6 horas de ayuno. Después de 1 hora tras la administración se recogerá sangre por la vena caudal ($\leq 100 \mu\text{l}$). Sólo se hará 1 vez a los animales que corresponda.</p> <p>P3 Recogida sangre por vena caudal: el animal será introducido en una caja de contención o cepo dejando la cola libre, se procederá a calentar la zona y con ayuda de una aguja de 25-30G se recogerán $< 100 \mu\text{l}$ de sangre. Frecuencia: en alguna serie de animales se tomarán muestras sobre el mismo animal 1 vez a las 3-4 semanas de vida, 1 vez a las 18 y 1 vez a las 25 semanas de vida ($< 100 \mu\text{l}$). En otros animales sólo 1 vez a las 25 semanas de vida.</p> <p>P4 Tratamiento subcrónico a animales adultos CHFD de 25 semanas con un anticuerpo neutralizante de cabra dirigido frente a la OPN de ratón (R&D System) o con una IgG de cabra control (R&D System) durante 5 días por vía intraperitoneal (20 μg/ rata) (Xanthou et al. Nat Med 13(5): 570-578, 2007). Dos días después de la última inyección los animales serán sacrificados para recoger sus tejidos.</p> <p>P5</p> <p>P6</p> <p>P7</p> <p>P8</p> <p>P9</p> <p>P10</p>	<p>Duración P1: 1min/rata a las 3 semanas de vida y a las 25 semanas de vida.</p> <p>Duración P2: 6 h ayuno + 3-5 min administración + 1h espera.</p> <p>Duración P3: 2 min/rata</p> <p>Duración P4: 2min/rata durante 5 días.</p> <p>Duración P5:</p> <p>Duración P6:</p> <p>Duración P7</p> <p>Duración P8</p> <p>Duración P9</p> <p>Duración P10</p>
<p>Severidad esperada del procedimiento (ver anexo I)</p>	

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 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"/>

Observaciones evaluador

METODOLOGÍA

Administración/Inoculación

Producto / Concentración / Medio ¹¹	Vía	CANTIDAD (volumen, peso, etc)	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº veces Total
1.- Anticuerpo neutralizante anti-OPN de cabra frente a OPN de ratón o IgG de cabra control (R&D Systems) (0,2mg/ml en PBS estéril; 20 µg/ rata). 2.- Sonda fluorescente de 4000Da de isotiocianato de fluoresceína conjugada con dextrano (DX-4000-FITC; Sigma-Aldrich).	1.- Intraperitoneal 2.- Oral con una sonda gástrica	1.- 20 µg/ rata 2.- 500mg/kg peso (125 mg/ml).	1.- 5 días (diariamente) 2.- 1 vez	1.- 5 veces 2.- 1 vez

Toma de muestras

Muestra ¹²	Vía	CANTIDAD (volumen, peso, etc)	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº veces Total
1.- Recogida de heces frescas para metagenómica 2.- Recogida de sangre	2.- Vena caudal	2.- Menos de 100 microlitros	1.- A las 4 y a las 25 semanas de vida 2.- 1 vez a las 4, 18 y 25 semanas de vida	1.- 2 veces 2.- 3 veces

Procedimientos conductuales

Descripción

Duración	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº de veces totales
----------	--------------------------------	---------------------

Ayunos		
Duración	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº de veces totales
6h	1 vez antes administración sonda fluorescente DX4000-FITC	1
14-16h	1 vez antes del sacrificio	1
<input type="checkbox"/> Agua		
<input checked="" type="checkbox"/> Comida		
Procesos quirúrgicos		
Descripción:		

Observaciones evaluador

6. APLICACIÓN DE MÉTODOS PARA REEMPLAZAR, REDUCIR Y REFINAR (3R) EL USO DE ANIMALES EN PROCEDIMIENTOS

Justificación de la necesidad de utilización de animales ¹³	
¿Existe un método alternativo?	<p>Si se cree que no existen métodos alternativos, explicar cómo ha llegado a esa conclusión. Citar las fuentes consultadas:</p> <p>El trabajo que se propone en este Proyecto 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. Brevemente, las ratas gestantes serán sometidas 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 (45% D12451, Research Diets). El uso de animales de experimentación en este Proyecto es esencial para estudiar el impacto que la nutrición materna tiene sobre el desarrollo de una microbiota intestinal adecuada en las crías así como la señales implicadas en la comunicación entre distintos tejidos (intestino-páncreas-tejido adiposo) que puedan predisponer al desarrollo de patologías metabólicas en la edad adulta. Por lo tanto, para la realización de los objetivos expuestos en el punto 1 de esta memoria es indispensable llevar a cabo estudios in vivo. Asimismo, de especial interés en los estudios propuestos sobre el páncreas endocrino, es la necesidad de trabajar con cultivos primarios de islotes de Langerhans. Los islotes pancreáticos son unidades estructurales donde el funcionamiento de un tipo celular está regulado por el comportamiento de las células vecinas. Es más, en el objetivo 3, tarea 3.5 se busca precisamente profundizar en la interrelación entre las células alfa y beta dentro del islote. No obstante, con el fin de minimizar el número de animales, una parte importante de estos experimentos, dirigidos a estudios más moleculares, se ha diseñado sobre líneas de células secretoras de insulina y glucagón como son las INS-1E y las αTC1, respectivamente.</p>
Justificar el tamaño de la muestra y método estadístico utilizado para ello (animales a utilizar/grupo)	<p>Número de experimentos a realizar y número de animales por cada experimento:</p> <p>Por cada experimento que se va a realizar:</p> <p>- Número de grupos de animales que se van a formar: 4</p>

- Nivel de significación del test o de los tests a realizar: 0.05
- Potencia requerida del test o de los test: $\geq 80\%$
- Diferencia en las respuestas de los grupos que se desea detectar (en términos absolutos o en desviaciones típicas): asumiremos como estadísticamente significativo una diferencia de medias de 1,2 veces la desviación típica a lo largo de todo el Proyecto
- Número de animales por grupo y número total de animales:
Para calcular el tamaño muestral de ratas tenemos en cuenta que buscamos un intervalo de confianza de $p < 0,05$ con una potencia del método estadístico $\geq 80\%$ y que asumiremos como estadísticamente significativo una diferencia de medias de 1,2 veces la desviación típica a lo largo de todo el Proyecto. Con todo ello, 7-8 ratas por cada grupo o 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 (SPSS versión 22.0) con garantías de obtener resultados estadísticamente fiables.

OBJETIVO 1: Estudio longitudinal de la microbiota y función intestinal.
 $n=8$ ratas x 4 grupos dietéticos (C, S, CHFD, SHFD)
Número ratas objetivo 1: 32.

En este objetivo se pretende hacer un estudio longitudinal de diversos parámetros y biomarcadores que nos darán información sobre el desarrollo, asociado al tiempo en dieta, de disbiosis intestinal. Así, a ratas de 3-4 semanas de vida, controles (C; 16 ratas) y subnutridas (S; 16 ratas) se les tomarán muestras de heces y sangre. Se iniciará la dieta grasa de modo que aleatoriamente se harán otros dos subgrupos a partir de los grupos anteriores, formándose 4 poblaciones (C, S, CHFD, SHFD; $n=8$). A las 18 semanas de vida (15 semanas en dieta grasa) se les tomarán muestras de sangre y a las 25-26 semanas de vida de sangre y heces. Los animales se sacrifican a las 25 semanas de vida y distintos tejidos se recogerán y procesarán de distintas maneras según el destino planeado, pudiendo ser usados para la consecución de más de un objetivo.

OBJETIVO 2: Papel de los LPS intestinales sobre la funcionalidad y viabilidad de las células beta pancreáticas:

- Con el fin de optimizar el uso de animales, los estudios en tejido pancreático (Tarea 2.1) de expresión génica (RT-qPCR) o inmunohistoquímica se harán sobre distintas porciones de páncreas recogidas de los 32 animales indicados para la realización del objetivo 1.
- Para los estudios con islotes de Langerhans aislados se tendrá en cuenta que de cada rata adulta se obtienen alrededor de 300-400 islotes (el grupo tiene una gran experiencia en esta metodología).

a) Estudios de expresión génica (Tarea 2.2): se necesitan 100-120 islote/muestra.

4 poblaciones (C, S, CHFD, SHFD) x 8 muestras = 32 x 120 islotes = 3840 islotes

$n = 12$ ratas (3 ratas de cada población)

b) Estudios de funcionalidad (Tarea 2.3): se necesitan 10 islotes /muestra
Se proponen 2 experimentos en los que se necesitarán en total de 560 islotes por tipo de rata (C, S, CHFD, SHFD).

n = 8 ratas (2 ratas de cada población)

c) En la Tarea 2.4 (sección 2.4.1.) se propone un experimento sencillo en islotes de animales controles para analizar el efecto de un tratamiento a una dosis/tiempo fijo por lo que sólo tendremos dos condiciones: sin/con tratamiento. Los resultados se analizarán con una t-Student donde el número de muestras/condición será de 6 (120 islotes/ muestra), total 1440 islotes, es decir 5 ratas (todas población control).

- Finalmente, en la sección 2.4.2 se propone hacer un tratamiento subcrónico a animales adultos CHFD de 25 semanas con un anticuerpo neutralizante de cabra dirigido frente a la OPN de ratón (Abcam) o con una IgG de cabra control (Abcam) durante 5 días por vía intraperitoneal (20 μ g/ rata) (Xanthou et al. Nat Med 13(5): 570-578, 2007). Dos días después de la última inyección los animales serán sacrificados para recoger sus tejidos.
n = 6 x 2 poblaciones CHFD (tratadas y no tratadas) = 12 ratas CHFD (t-Student)

Número ratas objetivo 2: 37 ratas

OBJETIVO 3: Papel de los SCFAs sobre la funcionalidad y viabilidad de las células alfa y beta pancreáticas:

Gran parte de este trabajo se hará en la línea celular α TC1, sin embargo, dado que las líneas de células inmortalizadas a veces presentan diferencias fenotípicas y de función respecto a otros sistemas más fisiológicos como son los islotes completos, algunos resultados una vez obtenidos en las α TC1 deberán corroborarse en islotes aislados de ratas controles de 25 semanas de vida.

Tarea 3.1. Estudios histológicos en páncreas (sección 3.1.3): se utilizarán los mismos páncreas procesados en el objetivo 1.

Tarea 3.2. Efecto de los SCFAs sobre la secreción de glucagón y GLP-1 en islotes aislados:

Se necesitan 10 islotes por muestra (n=8). Tenemos 6 condiciones de secreción. 1 sola población de ratas (controles).

$10 \times 8 \times 6 = 480$ islotes (2 ratas controles).

Tarea 3.3. Efecto de los SCFAs sobre el contenido de GLP-1/glucagón en islotes aislados (sección 3.2.2):

Se necesitan 10 islotes por muestra (n=8). Tenemos 3 condiciones de estimulación. 1 sola población de ratas (controles).

$10 \times 8 \times 3 = 240$ islotes (1 rata control).

Tarea 3.4. Efecto de los SCFAs sobre la replicación de células alfa en islotes aislados:

Se necesitan 20 islotes por muestra o punto (n=8). Tenemos 2 condiciones de estimulación. 1 sola población de ratas (controles).

$20 \times 8 \times 2 = 240$ islotes (1 rata control).

Tarea 3.5. Tratamiento in vitro de islotes aislados con STZ:

Se necesitan 20 islotes por condición (n=8). Tenemos 4 condiciones de estimulación. 1 sola población de ratas (controles).

$20 \times 8 \times 4 = 640$ islotes (3 ratas controles).

Número ratas objetivo 3: 7 ratas

OBJETIVO 4: Estudios en tejido adiposo.

	<p>Dado que el desarrollo de este objetivo se realizará en animales de 25 semanas de vida de las 4 poblaciones C, S, CHFD y SHFD, en condiciones basales (sin administración de ningún fármaco u otro tipo de sustancia), con el fin de minimizar el número necesario de animales se tomarán las muestras tisulares de las ratas indicadas en los apartados anteriores en el momento del sacrificio.</p> <p>Número total de ratas del Proyecto: 76 ratas</p>
<p>Métodos de Refinamiento para mejorar el bienestar animal</p>	<p>Justificar las decisiones tomadas:</p> <p>Para abordar los objetivos propuestos en este Proyecto se utilizarán ratas Wistar gestantes compradas al distribuidor Harlan Laboratories y mantenidas en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) con el fin de controlar diaria y estrechamente la cantidad de alimento ingerido por los animales puesto que nuestro grupo trabaja con un modelo de restricción-rehabilitación nutricional previamente validado (de Toro-Martín et al. Endocrinology 2014; Escrivá et al. Am J Physiol 263(1 Pt 1):E1-7, 1992). En este modelo, las ratas gestantes son sometidas 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 realimentan ad libitum con una dieta obesogénica con un alto contenido en grasa (45% D12451, Research Diets). El motivo para utilizar este modelo es porque el Proyecto planteado pretende ser una continuidad de un Proyecto anterior (BFU 2011-25420). Aunque existen estudios en humanos sobre disbiosis de la microbiota intestinal en enfermedades como la diabetes tipo 1 y 2 el uso de este modelo animal nos puede permitir realizar por una parte, estudios longitudinales antes y después de aparecer la enfermedad y, por otro lado, bajar a un nivel más molecular manteniéndonos siempre dentro de un entorno fisiológico en donde no se pierdan las señales que comunican unos tejidos con otros.</p> <p>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 estos modelos animales y, por tanto, disminuyendo el sufrimiento de los mismos.</p> <p>Los únicos procedimientos leves que se aplicarán de manera repetida serán la recogida de sangre y el tratamientos farmacológico subcrónico de neutralización, absolutamente necesario para la consecución de los objetivos. Al plantear el número de animales necesario para el ensayo ya se tuvo en cuenta el mínimo tamaño de muestra para evitar repetición de procedimientos en un mismo animal.</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 1201/2005).</p>
<p>Medidas para evitar la repetición injustificada de procedimientos</p>	<p>Los únicos procedimientos que se repetirán en los mismos animales son la recogida de sangre en los estudios longitudinales (1 vez a 3, 18 y 25 semanas de vida) y el tratamiento farmacológico subcrónico (5 días) con el anticuerpo neutralizante anti-osteopontina (R&D Systems) de administración intraperitoneal necesario para determinar la función fisiopatológica de esta glicoproteína/citoquina en el páncreas (objetivo 2, subtarea 2.4.2).</p> <p>Al plantear el número de animales necesario para los ensayos ya se tuvo en cuenta el mínimo tamaño de muestra para evitar repetición innecesaria de procedimientos en un mismo animal.</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 (3 miembros del equipo</p>

	habilitados en las categorías B y C del RD 1201/2005).
Estimación del número total de animales del proyecto (incluida la cría de líneas)	76-80

Observaciones evaluador

7. 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

Descripción Analgésicos/Nombre y Concentración	Dosis, Vía y Frecuencia ¹⁴	Nº veces Total
Descripción de Anestésicos/ Nombre y Concentración	Dosis, Vía y Frecuencia ¹⁴	Nº veces Total

Observaciones evaluador

8. USO DE PUNTOS FINALES HUMANITARIOS

Destino final de los animales	
<input type="checkbox"/> Recuperación <input type="checkbox"/> Reutilización	<input checked="" type="checkbox"/> Sacrificio. Método (actuación, medicamento / concentración principio activo, vía, dosis, intervalo de dosis, etc.) y persona responsable de la eutanasia: Decapitación sin anestesia (dada la necesidad de recuperar tejidos y muestras sanguíneas libres de contaminantes químicos así como para evitar alteración de la glucemia y otros parámetros sanguíneos por influencia de la anestesia)
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: Los animales que se van a usar en este Proyecto no van a ser sometidos a ningún procedimiento que le cause dolor o sufrimiento que requiera medidas paliativas para el dolor. Ahora bien, en caso de detectar alguna complicación como consecuencia por ejemplo de la administración intraperitoneal repetida (subcrónica) de las drogas señaladas en los distintos objetivos indicados en el presente Proyecto (anticuerpo neutralizante de OPN) que suponga el sufrimiento del animal por infección o trauma se administrará un analgésico según criterio del veterinario (Ej. meloxicam 2mg/kg ip). Si aun así el animal no	

mejora se procederá a aplicar la finalización anticipada del estudio con ese animal concreto por eutanasia del mismo. Asimismo, si en el caso de la administración de sustancias por vía oral con sonda gástrica se produjese la entrada de la sustancia a la vía respiratoria se eutanzará al animal. Este mismo punto final se aplicará en el hipotético caso de que un animal sufra una contingencia inesperada (accidente o traumatismo, enfermedad irreversible...).

Observaciones evaluador

9. DATOS DE LAS MODIFICACIONES GENÉTICAS (si procede)

Nombre de la línea modificada	Modificación / Fenotipo ¹⁵	Severidad

Cualquier línea añadida con posterioridad en el proyecto será clasificada como severa hasta que no se observe dolor, sufrimiento y daño en los animales durante el primer año de vida.

Observaciones evaluador

10. CONDICIONES DE ALOJAMIENTO, ZOOTÉCNICAS Y DE CUIDADO DE LOS ANIMALES

Estabulación		
Aislamiento (si/no)	Si se aísla (duración y justificación)	
No		
Método físico de contención (jaula metabólica, cepo de sujeción...)	Duración	Justificación
Cepo de sujeción	5 min	Toma de sangre
Especificar los requerimientos particulares de manejo (si los hubiera para los animales de este ensayo)		
Problemas conocidos relacionados con la reproducción y cría de cualquier especie, raza, estirpe o línea que se vaya a utilizar en el proyecto		
No		
Requiere el presente proyecto la modificación de cualquier parámetro medioambiental del animal		
No		
Protocolo de supervisión de los animales (diario, semanal, mensual, momento crítico...)		

Diario para controlar la ingesta de alimento

Observaciones evaluador

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 aliviado, 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).

INSTRUCCIONES CUMPLIMENTACIÓN FORMULARIO/MEMORIA

1) TIPO DE PROYECTO :

TIPO I

Aquellos proyectos en los que se dan simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como "sin recuperación", "leves" o "moderados".
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser autorizados por un proceso simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

TIPO II

Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como "sin recuperación", "leves" o "moderados".
- b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

TIPO III

Los proyectos diferentes de los tipos I o II y que no estén sujetos a cláusula de salvaguardia. Los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sujetos a posteriori a una evaluación retrospectiva.

2) Escribir d por "días", m por "meses" y a por "años".

3) Es el número de animales (de cada grupo) por cada experimento.

- 4) Es el número de experimentos que se realizará con cada grupo.
- 5) El número total de animales por cada grupo se calcula automáticamente de los datos anteriores.
- 6) R.D. 53/2013: Procedimiento: Toda utilización de un animal que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongados, incluida toda actuación que de manera intencionada o casual pueda dar lugar al nacimiento de un animal en las condiciones anteriormente mencionadas. Se considera, asimismo, "procedimiento" la utilización de los animales, aun cuando se eliminen el dolor, el sufrimiento, la lesión, la angustia o el daño prolongados, mediante el empleo de anestesia, analgesia u otros métodos. Quedan excluidos los métodos admitidos en la práctica moderna (métodos humanitarios) para el sacrificio y para la identificación de los animales.
- 7) R.D. 53/2013: Duración del procedimiento: Tiempo transcurrido desde que se inicia la preparación de un animal hasta que termina la última observación con ese animal.
- 8) Cuando se decida la adscripción a un procedimiento estandarizado o a un PA previamente autorizado por este Comité, se podrán rellenar solo los datos que no están incluidos en él.
- 9) Para procedimientos nuevos o los que no se desee adscribir a otro.
- 10) Indicar brevemente la cadena de actuaciones con el animal. Cuando las directrices de un procedimiento animal estén publicadas o validadas con carácter oficial, se aportará la copia correspondiente. Si no se concretan productos en los apartados correspondientes, concretarlos aquí. P.e.: si se administran diferentes antígenos, pero el procedimiento es igual para todos ellos, se definirán aquí en lugar de en el apartado de inoculación, donde se hará más genéricamente.
- 11) Si se administran productos diferentes a grupos diferentes, relacionarlos correspondientemente. P.e.:--Gr.A) medicamento / 1% / PBS. --Gr.B.) placebo / 1% / PBS.
- 12) Si se toman / extraen muestras diferentes a grupos diferentes, relacionarlos correspondientemente
- 13) R.D. 53/2013: No deberá realizarse un procedimiento, si se dispone de otro método científicamente satisfactorio y contrastado, que permita obtener el resultado perseguido sin implicar la utilización de animales, excepto cuando la normativa de aplicación lo requiera. Si no existen métodos alternativos, en todo caso se reducirá el número y el sufrimiento de los animales. (SELECCIONAR UNA DE LAS SIGUIENTES RAZONES. Cuando se elija otros motivos, especificarlos).
La cumplimentación de este campo es obligatorio para su evaluación. La normativa actual obliga a usar el mínimo número de animales necesario para los fines del ensayo. Se debe explicar claramente y con justificación estadística la necesidad del número de animales en cada experimento y la razón del número de experimentos.
- 14) Farmacología: dosis es el contenido de principio activo de un medicamento, expresado en cantidad por unidad de toma, por unidad de volumen o de peso en función de la presentación, que se administrará de una vez.
- 15) Especificar la modificación, el fenotipo a que da lugar y la repercusión que puede tener en el animal.

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 de 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 de 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.

**MEMORIA DE CONTENIDOS (según Anexo X del RD 53/2013:
Elementos a los que se refiere el Art. 33.1)**

INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL PROYECTO

Nombre: Dolores Prieto Ocejo

Facultad: Farmacia

Departamento: Fisiología (F. Animal)

Campus: Moncloa

Otros (especificar)

Teléfono: 913947193

Correo electrónico: dprieto@ucm.es

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN O ACTIVIDAD

Título: "DISFUNCIÓN VASCULAR, ESTRÉS OXIDATIVO Y NEFROPATÍA ASOCIADA A LA OBESIDAD"

FINALIDAD DEL INFORME

Presentación de proyecto para ser financiado

Organismo: Ministerio de Economía y Competitividad

Convocatoria: Programa I+D+i
orientada a retos de la
sociedad Convocatoria
Convocatoria 2015

Proyecto financiado en ejecución

Organismo:

Referencia:

Autorización de actividad de servicio o experimentación con animales (con cargo Artº 83 u otra financiación)

Otros (publicación, informes, etc...). Especificar:

Madrid, a 7 de Septiembre de 2015

Firma:

V.B. VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN

Firma:

INVESTIGADOR PRINCIPAL

1. DATOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN O PROCEDIMIENTO

Título	"DISFUNCIÓN VASCULAR, ESTRÉS OXIDATIVO Y NEFROPATÍA ASOCIADA A LA OBESIDAD"	Fecha inicio	2015
		Fecha finalización	2018
Resumen	<p>Estudios epidemiológicos actuales indican que la obesidad constituye un factor de riesgo de enfermedad renal crónica independiente de la presencia de diabetes, hipertensión y otras comorbilidades (de Vries et al., Lancet Diabetes Endocrinol 2:417, 2014). Dado que el estrés oxidativo es un factor clave establecido en la patogénesis de la nefropatía diabética, el objetivo general del presente proyecto es evaluar las características de la disfunción endotelial renal en la obesidad y determinar los efectos de la producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (ROS) en dicha disfunción y en el desarrollo de alteraciones hemodinámicas que conducen a la enfermedad renal. La función vascular renal se evaluará en arterias intrarrenales de un modelo experimental de obesidad genética/Síndrome Metabólico mediante el uso de miógrafos vasculares para el estudio de las repuestas vasodilatadoras, técnicas ratio-fluorométricas para medidas dinámicas de calcio y técnicas de pathc-clamp para el registro de corrientes iónicas en células endoteliales y miocitos vasculares renales, técnicas de luminiscencia y fluorescencia para el estudio de la producción vascular endógena de ROS en la pared arterial y técnicas inmunocitoquímicas y de Western Blot, y ensayos de actividad enzimática para evaluar las variaciones de los sistemas generadores de ROS y de los sistemas antioxidantes en el riñón de animales obesos.</p>		
Objetivos	<p>Los objetivos de este Proyecto son: a) determinar el papel de las ROS en la función vascular renal normal y su posible participación en las vasodilataciones dependientes del endotelio en respuesta al flujo sanguíneo y en la regulación del metabolismo del calcio de las células musculares y endoteliales de las arterias renales; b) evaluar los cambios que se producen en el estado REDOX de las arterias renales en el curso de la obesidad y los efectos específicos de la producción incrementada de ROS sobre la función endotelial, el metabolismo del calcio y los procesos de proliferación y fibrosis de la pared vascular en arterias de animales obesos en comparación con sus controles sanos; c) investigar los posibles efectos renoprotectores y mecanismos de diferentes agentes destinados a reducir el estrés oxidativo que pueden prevenir el desarrollo de la nefropatía en la obesidad, identificando así dianas terapéuticas efectivas para esta patología.</p>		
Importancia de la Investigación	<p>Explicar los beneficios científicos de este trabajo en el avance del conocimiento, o en el bien para la sociedad: En el presente proyecto se pretende determinar el papel del estrés oxidativo en la patogénesis de la disfunción endotelial y vascular renal en un modelo animal experimental de obesidad/resistencia a la insulina, así como también la valoración de los mecanismos de diferentes compuestos antioxidantes que puedan tener un potencial terapéutico por su acción renoprotectora sobre la estructura y la función renal en la nefropatía de la obesidad, identificando así dianas terapéuticas efectivas para esta patología.</p>		
Análisis previsto de los resultados	<p>Describir el diseño experimental, de observación y modelo estadístico para reducir al mínimo el número de animales y el impacto ambiental cuando proceda: El empleo de un número mínimo de animales se garantizará en base al modelo estadístico utilizado. Las diferencias estadísticas serán calculadas aplicando el test de la t de Student para observaciones pareadas y el análisis de varianza (ANOVA) para comparaciones múltiples, considerándose las diferencias significativas con un nivel de probabilidad de $P < 0.05$. Dicho modelo estadístico y su aplicación con el fin de reducir al mínimo el número de animales de experimentación a utilizar está avalado por diversas publicaciones del grupo de investigación en revistas científicas que se recogen en la bases de datos Citation Index (Villalba et al., Am J Physiol 297: H696, 2009; Am J Physiol 300:H2044, 2011; Contreras et al., Br J Pharmacol 161:350, 2010; Contreras et al., Atherosclerosis 217(2):331-9, 2011; Sánchez et al., Br J Pharmacol 154: 609, 2010; Sánchez et al., PLOS one 7(4):e36027201297, 2012).</p>		
Tipo de proyecto ¹			
Tipo I <input type="checkbox"/>		Tipo II <input checked="" type="checkbox"/>	Tipo III <input type="checkbox"/>

2. DOCUMENTOS QUE SE ADJUNTAN

<input checked="" type="checkbox"/> Copia Proyecto	<input checked="" type="checkbox"/> Publicaciones, nº: 5	<input checked="" type="checkbox"/> Procedimiento animal (publicado o validado)
<input type="checkbox"/> Otros (especificar):		

3. DATOS DE LOS PARTICIPANTES

Cargo o Puesto	G.C.*	Nombre	Centro
Investigador principal del proyecto	C	Dolores Prieto Ocejo	Farmacia
Investigador responsable del procedimiento	C	Dolores Prieto Ocejo	Farmacia
Investigador	B	Ana Alejandra Sánchez Pina	Farmacia
Investigador	C y B	Maria Pilar Martínez Saíñz	Veterinaria
Investigador	C	Luis Rivera de los Arcos	Farmacia
Investigador	D y C	Albino García Sacristán	Farmacia
	B	Belén Climent Flórez	Farmacia

* Grupo de Categoría según RD 53//2013. (E.t.): En trámite, en ese caso indíquese la persona que supervisa la realización del procedimiento.

4. DATOS DE LOS ANIMALES (incluidos los modificados genéticamente)

Descripción y número de animales por cada grupo (incluidos el grupo(s) control)									
Grupo	Especie	Raza/estirpe/línea	Sexo	Edad ² (d,m,a)	Peso	Procedencia	Nº por Exp ³	Nº Exps ⁴	Nº Total ⁵
A	Rata	Zucker obesa (fa/fa) RZO	M	4 m	500 g	Charles River Laboratories	2	60	120
B	Rata	Zucker control (fa/ma) RZL	M	4 m	300 g	Charles River Laboratories	1	60	60
C									0
D									0
E									0
F									0
G									0
H									0
I									0
J									0

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 de la SD de Fisiología, Facultad de Farmacia, UCM
Nº de Registro: ES280790000085
- 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:
- .- Condiciones y cuidado de los animales no estabulados (animales con propietario):

5. APLICACIÓN DE MÉTODOS PARA REEMPLAZAR, REDUCIR Y REFINAR (3R) EL USO DE ANIMALES EN PROCEDIMIENTOS

Justificación de la necesidad de utilización de animales ⁶

¿Existe un método alternativo?

Explicar otros motivos (especificar) No existen métodos alternativos.

La rata Zucker obesa es un modelo experimental bien establecido de obesidad genética y resistencia a la insulina causado por un gen disfuncional del receptor de leptina. Estos animales se utilizan como modelo de Síndrome Metabólico/resistencia a la insulina debido a una tolerancia alterada a la glucosa asociada a una mutación heredada del gen de la obesidad, y desarrollan progresivamente obesidad, diabetes tipo 2 e hipertensión (Zucker & Antoniades, *Endocrinology* 90: 12320, 1972; Bray, *Fed. Proc.* 36:148-153, 1977; Gueree Millo, *Biomed Pharmacother.* 51:318; 1997). Nuestro grupo ha confirmado recientemente que la RZO exhibe obesidad, hiperinsulinemia, hiperglucemia leve, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Además hemos demostrado alteraciones marcadas de las vasodilataciones dependientes del endotelio, alteraciones estructurales severas de la pared vascular y una hipercontractilidad aumentada en arterias de la RZO (Villalba et al., *Am J Physiol* 297: H696, 2009; *Am J Physiol* 300:H2044, 2011; Contreras et al., *Br J Pharmacol* 161:350, 2010; Sánchez et al., *Br J Pharmacol* 154: 609, 2010; Sánchez et al., *PLOS one* 7(4):e36027201297, 2012). Por estas razones, la rata Zucker obesa constituye un modelo idóneo para evaluar las alteraciones cardiovasculares que se producen en situaciones patológicas de resistencia a la insulina y obesidad, y se utilizarán en este proyecto para valorar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen al daño vascular renal en la obesidad. No es posible reproducir las condiciones de Síndrome Metabólico/prediabetes de este modelo mediante un modelo de cultivos celulares o de tejidos.

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>)

• Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (<http://iccvam.niehs.nih.gov/home.htm>)

Si se cree que no existen métodos alternativos, explicar cómo ha llegado a esa conclusión

Justificar el número de animales que se va a utilizar (Cumplimentación obligatoria)

Explicar claramente y con justificación estadística sobre la necesidad del número de animales de cada experimento y la razón del número de experimentos que se llevarán a cabo incluyendo la justificación del origen, especie/estirpe y etapa de la vida.

Para la realización del presente Proyecto se ha llevado a cabo un modelo predictivo estadístico, según el cual el número de animales a utilizar propuesto es el mínimo posible y no puede reducirse: 120 ratas Zucker obesas y 60 Ratas Zucker control. Es el análisis estadístico el que garantiza el uso del menor número de animales posible para la consecución de los objetivos propuestos. Las diferencias estadísticas se calculan mediante el test de la t de Student para observaciones pareadas y el análisis de varianza (ANOVA) para comparaciones múltiples y estas diferencias son consideradas como significativas con un nivel de probabilidad de $P < 0.05$. Para ello se utilizará 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).

Dicho modelo estadístico y su aplicación con el fin de reducir al mínimo el número de

	animales de experimentación a utilizar, está avalado por diversas publicaciones del grupo de investigación en revistas científicas que se recogen en la bases de datos Citation Index (Villalba et al., Am J Physiol 297: H696,2009; Am J Physiol 300:H2044, 2011; Contreras et al., Br J Pharmacol 161:350, 2010; Contreras et al., Atherosclerosis 217(2):331-9, 2011; Sánchez et al., Br J Pharmacol154: 609, 2010;; Sánchez et al., PLOS one 7(4):e36027201297, 2012).
Medidas para evitar la repetición injustificada de procedimientos	Después de realizar una búsqueda exhaustiva en la base de datos PubMed de los Institutos de Salud de los EEUU, hemos podido constatar que si bien existen algunos estudios que evalúan el efecto de la obesidad en la estructura renal utilizando modelos experimentales en rata de obesidad tanto genética como inducida por dieta, son escasos los estudios en estos modelos que evalúan la alteración de la función vascular renal y su contribución a la nefropatía y a la enfermedad renal en el curso de la obesidad. El modelo de rata Zucker obesa presenta características de obesidad genética y Síndrome Metabólico similares a los que se producen en el hombre, por lo que la originalidad del Proyecto que se plantea radica precisamente en esta extrapolación patogénica y clínica desde la metodología presentada, evitando la repetición injustificada de los procedimientos.
Estimación del número total de animales del proyecto (incluida la cría de líneas)	El nº de animales a utilizar en el Proyecto es el siguiente: - 2 ratas Zucker obesas/semana/3 semanas/20 meses= 120 animales - 1 rata Zucker control/semana/ 3 semanas/20 meses= 60 animales El número total de animales a utilizar en el Proyecto es de 180 animales en 3 años.

6. DATOS DE LAS MODIFICACIONES GENÉTICAS (si procede)

Nombre de la línea modificada	Modificación / Fenotipo ⁷	Severidad

Cualquier línea añadida con posterioridad en el proyecto será clasificada como severa hasta que no se observe dolor, sufrimiento y daño en los animales durante el primer año de vida.

7. DATOS DEL PROCEDIMIENTO ANIMAL ⁸ (Procedimiento: La utilización invasiva o no invasiva de un animal para fines experimentales u otros fines científicos, cuyos resultados sean predecibles o impredecibles, o con fines educativos, siempre que dicha utilización pueda causarles un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongado, equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja conforme a la buena práctica veterinaria). **Describir cada uno de los Procedimientos que se realizarán dentro del proyecto de Investigación.**

Título: "DISFUNCIÓN VASCULAR, ESTRÉS OXIDATIVO Y NEFROPATÍA ASOCIADA A LA OBESIDAD"	Duración ⁹ 3 años
--	------------------------------

Adscripción a un Procedimiento autorizado ¹⁰ Referencia: Se utilizarán paralelamente arterias intrarrenales procedentes de ratas macho sexualmente maduras de 17-18 semanas RZO y de ratas delgadas normales (RZL), siendo éstas últimas utilizadas como controles. Los animales serán proporcionados por Charles River Laboratories (Francia), y estabulados antes de su sacrificio en las instalaciones del Animalario de la SD de Fisiología Facultad de Farmacia de la UCM, y atendidos por personal especializado (categoría B) que les proveerá de dieta estándar y agua ad libitum hasta su sacrificio. Las condiciones ambientales y de estabulación de los animales estarán de acuerdo con los procedimientos referidos a las medidas sanitarias y de bienestar animal recogidos en la normativa del Real Decreto 53/2013 de 1 de Febrero de 2013 (BOE 8-2-2013), en consonancia con las directrices de la Unión Europea para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio. Los animales serán sacrificados en una cámara con CO₂ y posteriormente se procederá a su exanguinación por decapitación, para proceder posteriormente a la extracción de los riñones. Los estudios in vitro se llevarán a cabo con las arterias disecadas de los órganos extraídos del animal.

Para la valoración de los efectos de agentes antioxidantes como el tempol o inhibidores de la enzima NADPH oxidasa como la apocinina y plumbagina, las ratas OZR serán tratadas con los diferentes compuestos, bien administrados en el agua de bebida (tempol 1 mM, 10 semanas de administración; apocinina 2g/l, 8 semanas de administración) o por inyección intraperitoneal (plumbagina, 2mg/Kg/día).

Nuevo ¹¹ . Breve descripción de cada procedimiento que se realiza dentro del Proyecto ¹² :

P1 Administración del antioxidante tempol a una concentración 1 mM en el agua de bebida a las ratas OZR, (24 h/día, 10 semanas) (Knight et al., Am J Renal Physiol 298:F86-94, 2010).

P2 Administración del inhibidor de NADPH oxidasa apocinina a una concentración de 2g/L en el agua de bebida a las ratas OZR (24 h/día, 8 semanas) (Winiarska et al., Chemico-Biological Interactions 218:12-19, 2014).

P3 Administración del inhibidor de NOX4 plumbagina a una concentración de 0.2mg/Kg/día (5 días/semana, 8 semanas) por inyección intraperitoneal a las rats OZR (Hafez et al., Molecular Oncology 7: 428, 2012).

P1
P2
P3
P4
P5
P6

Duración P1: 10 semanas
Duración P2: 8 semanas
Duración P3: 8 semanas
Duración P4:
Duración P5:
Duración P6:

Severidad esperada del procedimiento (ver anexo I)				
Procedimiento	Leve	Moderado	Severo	Sin recuperación
P1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
P2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
P3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

METODOLOGÍA				
Administración/Inoculación				
Producto / Concentración / Medio ¹³	Vía	CANTIDAD (volumen, peso, etc)	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº veces Total
Plumbagina/ 1M/ fosfato buffer salino (PBS)	Intraperitoneal	0.2 mg/Kg peso	5 días semana/8 semanas	40
Anestésicos/Concentración ; Analgésicos/Concentración		Vía		Dosis (mg/kg) ¹⁴
Toma de muestras				
Muestra ¹⁵	Vía	CANTIDAD (volumen, peso, etc)	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº veces Total
Anestésicos/Concentración ; Analgésicos/Concentración		Vía		Dosis (mg/kg)

Procedimientos conductuales		
Descripción		
Duración	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº de veces totales
Ayunos		
Duración	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº de veces totales
<input type="checkbox"/> Agua		
<input type="checkbox"/> Comida		
Procesos quirúrgicos		
Descripción:		
Anestésicos/Concentración ; Analgésicos/Concentración	Vía	Dosis (mg/kg)
Otras actuaciones para reducir el dolor, evitar y aliviar cualquier forma de sufrimiento de los animales a lo largo de toda su vida, cuando proceda.		
Descripción	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº veces Total
Anestésicos/Concentración ; Analgésicos/Concentración	Vía	Dosis (mg/kg)
Destino final de los animales		
<input type="checkbox"/> Recuperación <input type="checkbox"/> Reutilización	<input checked="" type="checkbox"/> Sacrificio. Método (actuación, medicamento / concentración principio activo, vía, dosis, intervalo de dosis, etc.): El sacrificio de los animales se realizará por inhalación de CO2 y posterior exanguinación por decapitación, de acuerdo a la normativa recogida en el Real Decreto RD 53/2013. Los residuos orgánicos serán aislados en bolsas de plástico y congelados a -80°C hasta su recogida y retirada por los Servicios especializados del Ayuntamiento de Madrid.	
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:		

8.- CONDICIONES DE ALOJAMIENTO, ZOOTÉCNICAS Y DE CUIDADO DE LOS ANIMALES

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

9. 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 aliviado, 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).

INSTRUCCIONES CUMPLIMENTACIÓN FORMULARIO/MEMORIA

1) TIPO DE PROYECTO:

TIPO I

Aquellos proyectos en los que se dan simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como "sin recuperación", "leves" o "moderados".
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser autorizados por un proceso simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

TIPO II

Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como "sin recuperación", "leves" o "moderados".
- b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

TIPO III

Los proyectos diferentes de los tipos I o II y que no estén sujetos a cláusula de salvaguardia. Los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sujetos a posteriori a una evaluación retrospectiva.

- 2) Escribir d por "días", m por "meses" y a por "años".
- 3) Es el número de animales (de cada grupo) por cada experimento.
- 4) Es el número de experimentos que se realizará con cada grupo.
- 5) El número total de animales por cada grupo se calcula automáticamente de los datos anteriores.
- 6) R.D. 53/2013: No deberá realizarse un procedimiento, si se dispone de otro método científicamente satisfactorio y contrastado, que permita obtener el resultado perseguido sin implicar la utilización de animales, excepto cuando la normativa de aplicación lo requiera. Si no existen métodos alternativos, en todo caso se reducirá el número y el sufrimiento de los animales. (SELECCIONAR UNA DE LAS SIGUIENTES RAZONES. Cuando se elija otros motivos, especificarlos).
La cumplimentación de este campo es obligatorio para su evaluación. La normativa actual obliga a usar el mínimo número de animales necesario para los fines del ensayo. Se debe explicar claramente y con justificación estadística la necesidad del número de animales en cada experimento y la razón del número de experimentos.
- 7) Especificar la modificación, el fenotipo a que da lugar y la repercusión que puede tener en el animal.
- 8) R.D. 53/2013: Procedimiento: Toda utilización de un animal que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongados, incluida toda actuación que de manera intencionada o casual pueda dar lugar al nacimiento de un animal en las condiciones anteriormente mencionadas. Se considera, asimismo, "procedimiento" la utilización de los animales, aun cuando se eliminen el dolor, el sufrimiento, la lesión, la angustia o el daño prolongados, mediante el empleo de anestesia, analgesia u otros métodos. Quedan excluidos los métodos admitidos en la práctica moderna (métodos humanitarios) para el sacrificio y para la identificación de los animales.
- 9) R.D. 53/2013: Duración del procedimiento: Tiempo transcurrido desde que se inicia la preparación de un animal hasta que termina la última observación con ese animal.
- 10) Cuando se decida la adscripción a un procedimiento estandarizado o a un PA previamente autorizado por este Comité, se podrán rellenar solo los datos que no están incluidos en él.
- 11) Para procedimientos nuevos o los que no se desee adscribir a otro.
- 12) Indicar brevemente la cadena de actuaciones con el animal. Cuando las directrices de un procedimiento animal estén publicadas o validadas con carácter oficial, se aportará la copia correspondiente. Si no se concretan productos en los apartados correspondientes, concretarlos aquí. P.e.: si se administran diferentes antígenos, pero el procedimiento es igual para todos ellos, se definirán aquí en lugar de en el apartado de inoculación, donde se hará más genéricamente.
- 13) Si se administran productos diferentes a grupos diferentes, relacionarlos correspondientemente. P.e.:--Gr.A) medicamento / 1% / PBS. --Gr.B.) placebo / 1% / PBS.
- 14) Farmacología: dosis es el contenido de principio activo de un medicamento, expresado en cantidad por unidad de toma, por unidad de volumen o de peso en función de la presentación, que se administrará de una vez.
- 15) Si se toman / extraen muestras diferentes a grupos diferentes, relacionarlos correspondientemente

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 de 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 de 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.