



## **ACTA DE LA REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE ÉTICA Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE FARMACIA, CELEBRADA EL DÍA 18 DE NOVIEMBRE DE 2019**

En la Sala de Reuniones del Decanato de la Facultad de Farmacia, siendo las **13:00 horas** del día **18 de noviembre de 2019** se reúne el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Facultad de Farmacia, previamente convocado al efecto, bajo la presidencia de la Sra. Decana Profa. Dra. Dña. Irene Iglesias Peinado y actúa como Secretario el Prof. Dr. D. Rafael Lozano Fernández.

El **Orden del Día** es el siguiente:

- 1. Lectura y aprobación, si procede, del Acta de la Comisión celebrada el pasado 8 de septiembre de 2015**
- 2. Informe del Proyecto presentado por las Prof<sup>a</sup>. Elisa Fernández Millán y Prof<sup>a</sup> Carmen Álvarez Escolá del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular sobre: “Nuevas perspectivas sobre el papel del inflammasoma en la progresión del síndrome metabólico asociado al catch-up: estudio en tejidos colónicos y pancreáticos de rata.” (Se adjunta documentación).**
- 3. Ruegos y preguntas**

### **ASISTENTES**

Prof<sup>a</sup>. Dra. D<sup>a</sup> Irene Iglesias Peinado  
Prof. Dr. D. Rafael Lozano Fernández  
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-Portugués  
Prof<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. María Almudena Porras Gallo  
Prof. Dr. D. Luis Rivera de los Arcos

Excusa su asistencia la Prof<sup>a</sup>. Dra. D<sup>a</sup>. Juana Benedí González

- 1. Lectura y aprobación, si procede, del Acta de la Comisión celebrada el pasado 8 de septiembre de 2015.**

**Se aprueba el acta por asentimiento.**

- 2. Informe del Proyecto presentado por las Prof<sup>a</sup>. Elisa Fernández Millán y Prof<sup>a</sup> Carmen Álvarez Escolá del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular sobre: “Nuevas perspectivas sobre el papel del inflammasoma en la progresión del síndrome metabólico asociado al catch-up: estudio en tejidos colónicos y pancreáticos de rata.” (Se adjunta documentación).**

Una vez estudiada la documentación, previamente enviada a los miembros de la Comisión, aportada por las Prof<sup>a</sup>. Elisa Fernández Millán y Prof<sup>a</sup> Carmen Álvarez Escolá **se acuerda por unanimidad informar favorablemente para que dicho Proyecto de Investigación pueda ser llevado a cabo.**

**3. Ruegos y preguntas.**

No ha lugar.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión siendo las 13:30 horas del día de la fecha de cuyo contenido, que recoge la presente acta, como Secretario, doy fe.

**VºBº  
LA DECANA**



**Fdo.: Irene Iglesias Peinado**

**Madrid, 18 de noviembre de 2019  
EL SECRETARIO DE LA FACULTAD**



**Fdo.: Rafael Lozano Fernández**

**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: IP1: Elisa Fernández Millán/ IP2: Carmen Álvarez Escolá  
Facultad: Farmacia Departamento: Bioquímica y Biología Molecular  
Campus: Ciudad Universitaria Otros  
(especificar)  
Correo elfernan@ucm.es  
Teléfono: 913941857/52 electrónico: calvarez@ucm.es

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN O ACTIVIDAD**

Título: Nuevas perspectivas sobre el papel del inflammasoma en la progresión del síndrome metabólico asociado al catch-up: estudio en tejidos colónicos y pancreáticos de rata.  
Further insights into the role of inflammasome during metabolic syndrome progression associated to catch-up growth: study in colonic and pancreatic rat tissues.

**FINALIDAD DEL INFORME**

Presentación de proyecto para ser financiado  
Organismo: Ministerio de Ciencia, Innovación y  
Universidades

Convocatoria: 2019  
Ayudas a proyectos  
de I+D+i de los  
Programas  
Estatales de "Retos  
Investigación"  
(Proyectos RTI).  
Convocatoria  
general.

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 29 octubre del 2019

Firma: MARGARITA SAN ANDRÉS MOYA

V.B. VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN  
Y TRANSFERENCIA  
RESPONSABLE ADMINISTRATIVO DEL  
USUARIO

Firma: ELISA FERNÁNDEZ MILLÁN /  
CARMEN ÁLVAREZ ESCOLÁ

INVESTIGADOR PRINCIPAL

## 1. DATOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN O PROCEDIMIENTO

<b>Título</b>	Nuevas perspectivas sobre el papel del inflammasoma en la progresión del síndrome metabólico asociado al catch-up: estudio en tejidos colónicos y pancreáticos de rata.	Fecha inicio	01/01/2020
		Fecha finalización	31/12/2022
<b>Resumen</b>	<p>La prevalencia del síndrome metabólico (SM), 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 extremada gravedad. Se sabe que existe una fuerte asociación entre la dieta, la microbiota intestinal y la patofisiología del SM; sin embargo, la relación causa-efecto y las consecuencias derivadas de este trío necesitan ser investigadas con mayor profundidad. En este sentido, numerosos estudios epidemiológicos y de experimentación han demostrado que una nutrición materna inadecuada durante la etapa perinatal tiene un efecto negativo sobre la programación metabólica de la descendencia, incrementando el riesgo de los fetos y los neonatos a desarrollar SM cuando reciban una dieta hipercalórica y experimenten un crecimiento acelerado (catch-up growth). En trabajos previos hemos visto que la subnutrición por sí misma es capaz de alterar la composición del microbioma intestinal, con mayor prevalencia de bacterias mucolíticas. Este hecho, que se ve exacerbado cuando se induce el catch-up growth, compromete la integridad de la mucosa intestinal y favorece la aparición de inflamación metabólica. En relación con esto, el complejo de activación de los inflamasomas ha surgido como un punto crítico de control en la relación entre nutrición e inflamación. Por tanto, nosotros postulamos que la disbiosis temprana y mantenida que aparece en estos animales podría establecer un estado de inflamación crónica a nivel local y sistémico, afectando a tejidos claves para el control de la homeostasis glucídica como es el páncreas endocrino, lo cual a su vez, contribuiría al desarrollo de diabetes tipo 2. El Proyecto actual se centrará en estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso. Así, nuestro Objetivo General es la identificación de nuevas funciones del inflammasoma en el contexto del SM asociado a catch-up growth. Específicamente, este tema será abordado de la siguiente manera:</p> <p>En el Objetivo 1, trataremos de dilucidar el efecto del catch-up growth en el contexto inflamatorio intestinal. Para ello, analizaremos el estado de la barrera colónica y la susceptibilidad a desarrollar colitis en los animales malnutridos explorando de manera especial el papel del inflammasoma. En el Objetivo 2, en primer lugar buscaremos nuevas funciones de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como moduladores del inflammasoma en las células <math>\beta</math> pancreáticas. Posteriormente, gracias al uso de nuestro modelo animal de catch-up growth, diseñaremos un estudio de intervención orientado a identificar in vivo la potencial actividad anti-inflamatoria de los SCFAs sobre las células <math>\beta</math>.</p>		
<b>Objetivos</b>	<p>Objetivo General: identificar nuevas funciones del inflammasoma en el contexto del SM asociado a catch-up growth (crecimiento postnatal acelerado).</p> <p>Objetivos específicos:</p> <p>Objetivo 1. Caracterización del efecto del catch-up growth en el perfil inflamatorio intestinal.</p> <p>1.1. Análisis histológico de la función de barrera del colon. Caracterización de las células de Goblet.</p> <p>1.2. Análisis de la susceptibilidad a padecer colitis inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) en un modelo animal de restricción nutricional. Papel del inflammasoma.</p> <p>Objetivo 2. Identificación de nuevos factores moduladores del inflammasoma. Papel</p>		

	<p>de los receptores sensibles a nutrientes de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs).</p> <p>2.1. Análisis in vitro del posible papel de los SCFAs en la modulación del inflamasoma NLRP3 en células <math>\beta</math> pancreáticas.</p> <p>2.2. Análisis in vivo del posible papel de los SCFAs en la modulación del inflamasoma NLRP3 en células <math>\beta</math> pancreáticas: estudio en un modelo animal de administración de acetato en el agua de bebida.</p>
<p><b>Importancia de la Investigación</b></p>	<p>Explicar los beneficios científicos de este trabajo en el avance del conocimiento, o en el bien para la sociedad: El Síndrome Metabólico (SM) conlleva un enorme coste económico para el sistema sanitario público. Particularmente en España, se estima que en el año 2030 habrá alrededor de 27,2 millones de adultos con sobrepeso, lo que supondrá un coste adicional directo para el sistema de salud de aproximadamente 3.080 millones de euros por año. Hay que tener además en cuenta que estos pacientes frecuentemente necesitan mayores gastos de atención médica debido a las comorbilidades asociadas que padecen tales como diabetes, cáncer o enfermedades cardiovasculares. La detección temprana de personas con riesgo a padecer SM puede ayudar a tomar medidas antes de que se presente de forma manifiesta la enfermedad. Lo paradójico de este tema es que numerosos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto a nivel global la coexistencia de desnutrición y obesidad en un mismo individuo. Este hecho se explica porque una nutrición materna inadecuada durante la etapa perinatal tiene un efecto negativo sobre la programación metabólica de la descendencia. Así, el bajo peso al nacer se ha relacionado con una mayor predisposición a desarrollar obesidad y diabetes (encuadradas ambas patologías dentro del SM) cuando estos niños reciben una dieta hipercalórica que les hace experimentar un crecimiento acelerado (catch-up growth) fundamentalmente del tejido graso. A nivel experimental, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la malnutrición materna es capaz por sí misma de alterar la composición del microbioma intestinal de su descendencia, favoreciendo la prevalencia de bacterias mucolíticas. Este hecho, que se ve exacerbado cuando se induce el catch-up growth, compromete la integridad de la mucosa intestinal y favorece la aparición de inflamación metabólica. Dada la conexión entre microbiota, metabolismo y nutrición, en el presente Proyecto queremos profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso con especial interés en el estudio del inflamasoma. Creemos que los estudios que proponemos ayudarán a desarrollar estrategias exitosas para contrarrestar el impacto negativo de la desnutrición en las primeras etapas de la vida.</p>
<p><b>Análisis previsto de los resultados</b></p>	<p>Variable(s) que se va(n) a medir y unidad(es) de medida:</p> <p>OBJETIVO 1: Análisis histológico del estado de la barrera mucosa colónica y caracterización de las células de Goblet: medida del espesor de la mucosa (<math>\mu\text{m}</math>), número de células de Goblet (<math>\text{n}^\circ/\mu\text{m}^2</math>), densidad de gránulos de secreción/célula de Goblet; Estudio del mecanismo de autofagia en células de Goblet aisladas: medida del número de vacuolas autofágicas dentro de las células de Goblet, cuantificación relativa de los niveles de expresión proteica de proteínas implicadas en el flujo autofágico (densitometría, unidades arbitrarias), presencia de proteínas del inflamasoma en células de Goblet (microscopía confocal:cualitativo), penetración de bacterias en la capa de mucosa intestinal (puntuación arbitraria de 0-3: 0, sin presencia de bacterias en contacto con la capa interna de mucus; 1, 20% de las células epiteliales en contacto con bacterias; 2, 50% de las células epiteliales en contacto con bacterias; 3, 80% de las células epiteliales en contacto con</p>

bacterias). Susceptibilidad de los animales a colitis tras el tratamiento con dextrano sulfato sódico (DSS): análisis histológico del perfil inflamatorio del tejido colónico (puntuación arbitraria según criterios de la anatomopatológica); niveles de expresión génica (expresión relativa o RQ) y proteica (densitometría, unidades arbitrarias) de elementos de la cascada de activación del inflamasoma.

**OBJETIVO 2:** Gran parte de este objetivo se va a realizar en la línea celular de insulinoma de rata INS-1E. Análisis in vitro de los mecanismos de modulación del inflamasoma NLRP3 en células beta pancreáticas: 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 ( $\mu\text{g/ml}$ ); localización por microscopía de fluorescencia de elementos del inflamasoma (cualitativo). Análisis in vivo de la modulación del inflamasoma NLRP3 en células beta pancreáticas: 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); expresión génica (expresión 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: El estudio que se plantea en este Proyecto es MULTIFACTORIAL. Así, según los objetivos:

**OBJETIVO 1:**

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). 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 DSS (dextrano sulfato sódico): Con el fin de desarrollar un modelo animal de daño intestinal (colitis), a los animales CHF y SHF de 24 semanas de vida se les administrará en el agua de bebida, previamente autoclavada, un 2% de DSS durante 6 días (MP Biomedicals™ Mw:35–43 kDa). En paralelo llevaremos un grupo de animales CHF y SHF que únicamente recibirán agua de bebida estéril sin DSS. La distribución de los animales dentro de los distintos grupos experimentales se realizará de forma aleatoria. Los animales continuarán con la dieta alta en grasa durante todo el tratamiento. Se ha demostrado (Macia L. et al. Nat Commun. 6:6734, 2015) que el DSS es un tratamiento difícil dado que los animales pueden perder una cantidad significativa de peso corporal, por esta razón planeamos monitorizar a los animales diariamente para determinar su peso corporal, consistencia de las heces (0 = pellet bien formado; 1 = heces semiformadas que no se adhieren al ano; 2 = heces semiformadas que se adhieren al ano; 3 = heces líquidas que se adhirieron al ano) y presencia de sangre en las heces (0 = sin sangre al usar hemocultivo; 1 = hemocultivo positivo; 2 = rastros de sangre en las heces visibles; 3 = hemorragia rectal grave). Aquellos animales que pierdan un 15% o más de peso corporal respecto al de partida serán excluidos del estudio, interrumpiendo inmediatamente el tratamiento con DSS y dejándoles recuperar dado que no se está administrando una dosis letal. Además, la aparición de diarrea intensa y sanguinolenta acompañada de una posición encorvada, pelaje erizado y movilidad reducida del animal se considerará como punto final humanitario. Al final del tratamiento, las ratas serán sacrificadas por decapitación y se procederá a recoger las muestras tisulares y sanguíneas necesarias.

#### OBJETIVO 2:

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...).

Sobre los animales, los factores a tener en cuenta son:

A) Dieta: como se ha explicado para el objetivo 1.

B) Tratamiento con acetato: El acetato sódico (Sigma-Aldrich) se administrará a un grupo de animales CHF y SHF disuelto en el agua de



	<p>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.</p> <p>La distribución de los animales dentro de los distintos grupos experimentales se realizará de forma aleatoria.</p> <p>Modelo(s) estadístico(s) o metodología(s): El análisis estadístico que se realizará a lo largo de este proyecto será el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías según proceda. En los casos específicos que se compare 2 poblaciones/ tratamientos se hará una t-Student (Objetivo 2: estudios in vitro).</p> <p>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.</p> <p>(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.)</p>
--	---

Tipo de proyecto <sup>1</sup>		
Tipo I <input type="checkbox"/>	Tipo II <input checked="" type="checkbox"/>	Tipo III <input type="checkbox"/>

Observaciones evaluador

## 2. DOCUMENTOS QUE SE ADJUNTAN

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

Observaciones evaluador

## 3. DATOS DE LOS PARTICIPANTES

Cargo o Puesto	G.C.*	Nombre	Centro
Investigador principal del proyecto	D y C	Elisa Fernández Millán/Carmen Álvarez Escolá	Farmacia
Investigador responsable del procedimiento	D y C	Fernando Escrivá Pons	Farmacia
Miembro del equipo investigador	(e.t.)	Tamara Fernández Marcelo (supervisada por las IP: EFM y CAE)	Otras Entidades de Inves
Miembro del equipo de trabajo	C y B	Alicia Sánchez Roncero	Farmacia
Miembro del equipo de trabajo	C y B	Paula Martínez Oca	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

La Dra. Tamara Fernández Marcelo no realizará manipulación alguna sobre los animales, limitándose a realizar los experimentos oportunos con las muestras biológicas que previamente haya recogido alguno de los miembros restantes del presente Proyecto.

#### 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 <sup>2</sup> (d,m,a)	Peso	Procedencia	Nº por Exp <sup>3</sup>	Nº Exps <sup>4</sup>	Nº Total <sup>5</sup>
A	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (Control)	H	6m		ENVIGO	10	1	10
B	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (Subnutrida)	H	6m		ENVIGO	10	1	10
C	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (CHF: control high fat)	H	6m		ENVIGO	10	4	40
D	RATA (Rattus norvegicus)	Wistar (SHF: subnutrida high fat)	H	6m		ENVIGO	10	4	40
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**

<b>transporte</b>	
-------------------	--

<b>Centro de estabulación</b> Nombre y código de registro:	<input type="checkbox"/> 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) <input checked="" type="checkbox"/> 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):
---	--

<b>Observaciones evaluador</b>

**5. DATOS DEL PROCEDIMIENTO ANIMAL <sup>6</sup>(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 <sup>7</sup>
<input checked="" type="checkbox"/> Adscripción a un Procedimiento autorizado <sup>8</sup> Referencia: Modelo animal de restricción nutricional y posterior realimentación (BFU2016-77931-R), PROEX 349/15. <input checked="" type="checkbox"/> Nuevo <sup>9</sup> . Breve descripción de cada procedimiento (P) que se realiza en el Proyecto, indicando, en su caso, la duración y frecuencia de cada uno <sup>10</sup> : P1 Pruebas de tolerancia a la glucosa oral (oGTT): se usarán animales ayunados 16 horas y totalmente conscientes tomándose muestras de sangre de la vena caudal. Se administrará a los animales con sonda oral 2g/kg de peso corporal de glucosa, y se tomarán muestras de sangre (< 100µl) de la vena caudal a diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60 y 120 min) donde se analizará la concentración de glucosa usando un glucómetro compacto AccuCheck (Roche). P2 Prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal (ipITT): se utilizarán	Duración P1: 16 h ayuno + 3 min sonda oral/rata + 2h espera hasta recogida total sangre. Duración P2: 1 min inyección/rata + 1h

<p>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 (&lt; 100µl) y un glucómetro como se ha indicado antes.</p> <p>P3 Inducción de daño intestinal o colitis con Dextrano Sulfato Sódico (DSS): a los animales de 24 semanas de vida se les administrará en el agua de bebida, previamente autoclavada, un 2% de DSS durante 6 días (MP Biomedicals™ Mw:35–43 kDa). Método no invasivo. Se monitorizará a los animales diariamente para determinar su peso corporal, consistencia de las heces o presencia de sangre en las mismas (Macia L. et al. Nat Commun. 6:6734, 2015)</p> <p>P4 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). 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.</p> <p>P5 P6 P7 P8 P9 P10</p>	<p>espera hasta recogida total sangre.</p> <p>Duración P3: 6 días de tratamiento no invasivo.</p> <p>Duración P4: 3 semanas</p> <p>Duración P5: Duración P6: Duración P7 Duración P8 Duración P9 Duración P10</p>
--	---

<b>Severidad esperada del procedimiento (ver anexo I)</b>				
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 type="checkbox"/>	<input checked="" 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"/>

<b>Observaciones evaluador</b>

<b>METODOLOGÍA</b>
<b>Administración/Inoculación</b>

Producto / Concentración / Medio <sup>11</sup>	Vía	CANTIDAD (volumen, peso, etc)	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº veces Total
1.- D-Glucosa (solución acuosa al 40%) 2.- Insulina humana para inyección (Actrapid 100 UI/ml; NovoNordisk) 3.- Dextrano sulfato sódico (MP Biomedicals™ Mw:35-43 kDa) al 2% en agua de bebida esterilizada 4.- Acetato (acetato sódico de Sigma) disuelto en el agua de bebida esterilizada	1.- Oral 2.- Intraperitoneal 3.- Oral 4.- Oral	1.- 2g/kg peso 2.- 1 UI/kg peso 3.- Ad libitum 4.- Ad libitum	1.- 1 vez 2.- 1 vez 3.- 6 días (ad libitum) 4.- 3 semanas (ad libitum; [100/300 mM])	1.- 1 vez 2.- 1 vez 3.- 6 días (ad libitum) 4.- 3 semanas (ad libitum)

#### Toma de muestras

Muestra <sup>12</sup>	Vía	CANTIDAD (volumen, peso, etc)	Frecuencia (dosis 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)	2/animal

#### Procedimientos conductuales

##### Descripción

Duración	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº de veces totales

##### Ayunos

Duración	Frecuencia (dosis e intervalo)	Nº de veces totales
16h	1 vez antes de la administración oral de glucosa para el oGTT	1
14-16h	1 vez antes del sacrificio	

<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

<b>Justificación de la necesidad de utilización de animales <sup>13</sup></b>	
<p><b>¿Existe un método alternativo?</b></p>	<p>Si se cree que no existen métodos alternativos, explicar cómo ha llegado a esa conclusión. Citar las fuentes consultadas: 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) que puedan predisponer al desarrollo de patologías metabólicas en la edad adulta. Por lo tanto, para la realización de los objetivos expuestos en esta memoria es indispensable llevar a cabo estudios in vivo.</p> <p>Asimismo, de especial interés en los estudios propuestos sobre el páncreas endocrino (objetivo 2), es la necesidad de trabajar con cultivos primarios de islotes de Langerhans. Aunque con el fin de minimizar el número de animales, una parte importante de estos experimentos, dirigidos a estudios más moleculares, se ha diseñado sobre una línea de células secretoras de insulina como son las INS-1E, hay que tener en cuenta que los islotes pancreáticos son unidades estructurales donde el funcionamiento de un tipo celular está regulado por el comportamiento de las células vecinas. Este hecho explica que alguno de los resultados obtenidos en la línea INS-1E deban ser confirmados en un entorno más fisiológico como son los islotes primarios y posteriormente en el animal completo.</p>
<p><b>Justificar el tamaño de la muestra y método estadístico utilizado para ello (animales a utilizar/grupo)</b></p>	<p>Número de experimentos a realizar y número de animales por cada experimento:            10 ratas C x 1 experimento            10 ratas S x 1 experimento            10 ratas CHF x 4 experimentos            10 ratas SHF x 4 experimentos</p> <p>Por cada experimento que se va a realizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Número de grupos de animales que se van a formar: 4</li> <li>- Nivel de significación del test o de los tests a realizar: 0.05</li> <li>- Potencia requerida del test o de los test: 80%</li> </ul>

- 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 1,5 veces la desviación típica a lo largo de todo el Proyecto
- Número de animales por grupo y número total de animales: 10 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 con garantías de obtener resultados estadísticamente fiables. 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).

OBJETIVO 1: Caracterización del efecto del catch-up growth en el perfil inflamatorio intestinal.

- Grupos de animales:  
4 grupos dietéticos (C, CHF, S, SHF).  
Dentro de los grupos CHF y SHF se elegirán aleatoriamente 2 subgrupos que recibirán un tratamiento de 6 días con 2% de DSS:  
(CHF-2% DSS)  
(SHF-2% DSS)

- Nivel de significación del test: 0.05
- Potencia del test: 80%
- Diferencia en las respuestas de los grupos que se desea detectar: asumiremos como estadísticamente significativo una diferencia de medias de 1,5 veces la desviación típica.
- Número de animales por grupo y número total de animales:  
n=10 ratas C x 1 experimento; total 10 ratas C.  
n=10 ratas S x 1 experimento; total 10 ratas S  
n=10 ratas CHF x 2 experimentos; total 20 ratas CHF.  
n=10 ratas SHF x 2 experimentos; total 20 ratas SHF.  
La tarea 1.1 implica la realización de 1 experimento en donde se necesitarán 10 animales por cada grupo dietético. La tarea 1.2 implica la realización de otro experimento en donde un subgrupo de 10 animales del grupo CHF y 10 del grupo SHF van a recibir un tratamiento de 6 días en el agua de bebida con 2% de DSS estableciéndose diferencias en este experimento entre CHF, SHF, CHF-2% DSS y SHF-2%DSS. La recogida de muestras de los animales CHF y SHF sin tratamiento servirá tanto para la tarea 1.1 como 1.2.

Número total ratas del objetivo 1: 60 ratas.

OBJETIVO 2: Identificación de nuevos factores moduladores del inflammasoma.

- Grupos de animales:  
4 grupos dietéticos (C, CHF, S, SHF).  
Dentro de los grupos CHF y SHF se elegirán aleatoriamente 2

	<p>subgrupos que recibirán un tratamiento de 3 semanas con acetato en el agua de bebida (100 ó 300 MM) (Macia L. et al. Nat Commun. 6:6734, 2015): (CHF-Acetato100) (CHF-Acetato300) (SHF-Acetato100) (SHF-Acetato300)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nivel de significación del test: 0.05</li> <li>- Potencia del test: 80%</li> <li>- Diferencia en las respuestas de los grupos que se desea detectar: asumiremos como estadísticamente significativo una diferencia de medias de 1,5 veces la desviación típica.</li> <li>- Número de animales por grupo y número total de animales: Para la realización de la tarea 2.1, cuando sea necesario el uso de animales, se tomarán muestras de los mismos animales contemplados en la tarea 1.1 del objetivo 1, reduciendo de esta manera el uso de animales al mínimo necesario.</li> </ul> <p>La tarea 2.2 implica la realización de 2 experimentos. En cada uno de ellos los animales se tratarán con una dosis distinta de acetato, necesitando 10 animales por tratamiento y condición nutricional de partida. La recogida de muestras de los animales CHF y SHF sin tratamiento servirá tanto para las tareas contempladas en el objetivo 1 como para estos ensayos in vivo del objetivo 2. n=10 ratas CHF x 2 experimentos; total 20 ratas CHF. n=10 ratas SHF x 2 experimentos; total 20 ratas SHF.</p> <p>Número total ratas del objetivo 2: 40 ratas.</p> <p>Número total ratas del Proyecto: 100 ratas.</p>
<p><b>Métodos de Refinamiento para mejorar el bienestar animal</b></p>	<p>Justificar las decisiones tomadas: Para abordar los objetivos propuestos en este Proyecto se utilizarán ratas Wistar gestantes compradas al distribuidor Envigo 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 2016-77931-R). Aunque existen estudios en humanos sobre disbiosis de la microbiota intestinal en enfermedades como la diabetes, obesidad o la enfermedad inflamatoria intestinal, el uso de este modelo animal nos puede permitir realizar por una parte, estudios intervencionales antes y después de aparecer la enfermedad y, por</p>



	<p>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 este modelo animal y, por tanto, disminuyendo el sufrimiento de los mismos.</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 D 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 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 e ipITT y el tratamientos agudo con DSS en el agua de bebida, absolutamente necesarios para la consecución de los objetivos.</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 investigador están habilitados en las categorías C y D del RD 53/2013).</p>
<p><b>Estimación del número total de animales del proyecto (incluida la cría de líneas)</b></p>	<p>100</p>

<p><b>Observaciones evaluador</b></p>
<p> </p>

## 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 <sup>14</sup>	Nº veces Total
Meloxicam	2mg/kg, ip	Según recomendación del veterinario
Descripción de Anestésicos/ Nombre y Concentración	Dosis, Vía y Frecuencia <sup>14</sup>	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"/> <b>Sacrificio. Método (actuación, medicamento / concentración principio activo, vía, dosis, intervalo de dosis, etc.) y persona responsable de la eutanasia:</b> 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)
<b>Si no se realiza la eutanasia, actuación para reducir el sufrimiento a lo largo del resto de su vida:</b>	
<b>Criterios de punto final humanitario o de finalización anticipada del estudio o de la eutanasia anticipada del animal</b>	
<p>Explicar detalladamente el criterio para su aplicación: Se ha demostrado (Macia L. et al. Nat Commun. 6:6734, 2015) que el dextrano sulfato sódico (DSS) es un tratamiento que puede inducir en los animales la pérdida de una cantidad significativa de peso corporal, por esta razón planeamos monitorizar a los animales diariamente para determinar su peso corporal, consistencia de las heces (0 = pellet bien formado; 1 = heces semiformadas que no se adhieren al ano; 2 = heces semiformadas que se adhieren al ano; 3 = heces líquidas que se adhirieron al ano) y presencia de sangre en las heces (0 = sin sangre al usar hemocultivo; 1 = hemocultivo positivo; 2 = rastros de sangre en las heces visibles; 3 = hemorragia rectal grave). Aquellos animales que pierdan un 15% o más de peso corporal respecto al de partida serán excluidos del estudio, interrumpiendo inmediatamente el tratamiento con DSS y dejándoles recuperar dado que la administración de una dosis menor del 3% no es considerada letal (Perse and Cerar. J Biomed Biotechnol 2012). En caso necesario se administrarán analgésicos (ej. Meloxicam 2mg/kg ip). Además, la aparición de diarrea intensa y sanguinolenta acompañada de una posición encorvada, pelaje erizado y movilidad reducida del animal se considerará como punto final humanitario. En este caso, se finalizará anticipadamente el estudio y las ratas serán sacrificadas por decapitación, procediendo a recoger las muestras tisulares y sanguíneas necesarias.</p>	
<p>Asimismo, si en el caso de la administración de sustancias por vía oral con sonda gástrica (oGTT) se</p>	

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 <sup>15</sup>	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
NO		
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 y/o tratamientos químicos.		

## 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.