

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO

ANIMALES DE LABORATORIO

Otoño 2014 . Número 63

BIENESTAR ANIMAL

Un humor de ratas, o cómo saber cómo se sienten mis animales.

Reconocimiento y valoración del dolor en animales de experimentación.

Mucho ratón y mucha gente: codificación, marcado y genotipado de ratones en un animalario de barrera.

Entrevista: Violeta Solís Soto
Responsable de Bienestar Animal
GlaxoSmithKline I+D, Diseases of the
Development World Centre, Departamento
Laboratory Animal Sciences.



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

EEMPLAZAR

EDUCIR

EFINAR



Centrados en su investigación.

Como proveedor global de modelos de alta calidad de investigación, dietas y servicios de asistencia, Harlan Laboratories ha demostrado su rendimiento con equipos de investigación en todo el mundo. Nuestra misión es la de ayudarle a mejorar sus investigaciones.

Para más información, visite nuestra Web www.harlan.com o contacte con nosotros en rms.es@harlan.com

Modelos

Dietas

Servicios



GRUPO EDITOR

Grupo Editor



REVISTA DE LA SOCIEDAD

ESPAÑOLA PARA LAS
CIENCIAS DEL ANIMAL
DE LABORATORIO
www.secal.es

DIRECTORA

Teresa Rodrigo Calduch
direccion.revista@secal.es

SUBDIRECTOR

Hernán Serna Duque
direccion.revista@secal.es

EDITORES DE ESTILO E IMAGEN

Olga Fernández Rodríguez
Juan de Dios Hourcade Bueno
Lara Sedó Cabezón

PUBLICIDAD

Amaia Enbeita
publicidad.revista@secal.es

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

CONEXION E.P.
clientes@agenciaconexion.com.co

IMPRIME

LCS REPROGRAF

DEPÓSITO LEGAL

M-1362-1999

Responsables Secciones



**NOTICIAS SECAL
ACTUALIDAD**
Cristina Gerbolés Freixas
kgerboles@gmail.com



TÉCNICAS
María Granada Picazo
mgpicazo@secam.jccm.es



**ÉTICA Y LEGISLACIÓN
SEGURIDAD EN 5 MINUTOS**
Jesús Martínez Palacio
jesus.martinez@ciemat.es



¿Y TÚ QUÉ OPINAS?
José Luis Martín Barrasa
jlmbarrasa@gmail.com



LIBROS Y PÁGINAS WEB
Daniel Balzán Vicent
balzan@vivotecnia-ms.com



FACTOR HUMANO
Javier Fidalgo Fernández
fidalgo@ocelata.com

Junta de Gobierno

PRESIDENCIA

Javier Guillén Izco (2011-2015)

VICEPRESIDENCIA

Antonio Martínez Escandell (2013-2017)

SECRETARÍA

Elena Ciordia Balduz (2011-2015)

VICESECRETARÍA

Angel Naranjo Pino (2013-2017)

TESORERÍA

Isabel Blanco Gutiérrez (2011-2015)

VICETESORERÍA

Carlota Largo Aramburu (2013-2017)

VOCALÍAS

Rosa Bonavía Abril (2011-2015)
Juan de Dios Hourcade Bueno (2013-2017)
Leticia Martínez Caro (2011-2015)
NorayBio (2013-2017)
Luis Parra García (2011-2015)
Anna Puyol Altarriba (2011-2015)
María Reyes Panadero (2013-2017)
Juan Rodríguez Cuesta (2013-2017)

SOCIOS BENEFACTORES:

ANADE
ANIMALARIA
ANTONIO MATACHANA S.A.
BIOESCAPE GmbH
BIOSIS S.L.
CENTRE D'ELEVAGE JANVIER
CHARLES RIVER LABORATORIES
DINOX S.L.
DYNAMIMED
ETYCA S.L.
GLAXO SMITHKLINE
GRANJA S. BERNARDO
HARLAN LABORATORIES MODELS
MEVION TECHNOLOGY S.L.
IZASA S.A.
NIRCO S.L.
NORAY BIOINFORMATICS S.L.U.
PANLAB S.L.U.
RETTENMAIER IBERICA S.L.
SODISPAN RESEARCH SL
SOURALIT
SDS DIETEX FRANCE
STERILTECH S.L.
STERIS
VESTILAB S.A.
VIVOTECNIA

Tan cerca
como ellos,
del personal
del animalario.



Anúnciese en ANIMALES DE LABORATORIO,
la revista en habla hispana más importante del sector
y posicione sus productos directamente
en manos de los animalarios.

• Foto Shutterstock



www.secal.es

EDITORIAL

7 ACTUALIDAD

- El pez cebra como modelo válido de investigación del virus del ébola y el dengue.
- El ejercicio protege el cerebro de la depresión por estrés.
- Un "interruptor" en el ratón inhibe el apetito.
- Ratones avatar para pacientes afectados de cáncer.

12 ARTÍCULOS

- Reconocimiento y valoración del dolor en animales de experimentación.
- Un humor de ratas, o cómo saber cómo se sienten mis animales.
- Bienestar animal en el pez cebra. Conceptos generales.
- La severidad en los procedimientos. Algunas consideraciones para su evaluación.

36 TÉCNICAS

- Mucho ratón y mucha gente: codificación, marcado y genotipado de ratones en un animalario de barrera.

41 FACTOR HUMANO

- Bienestar animal y emociones humanas.

44 LIBROS Y PÁGINAS WEB

- Necesarios y fundamentales.

47 ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?

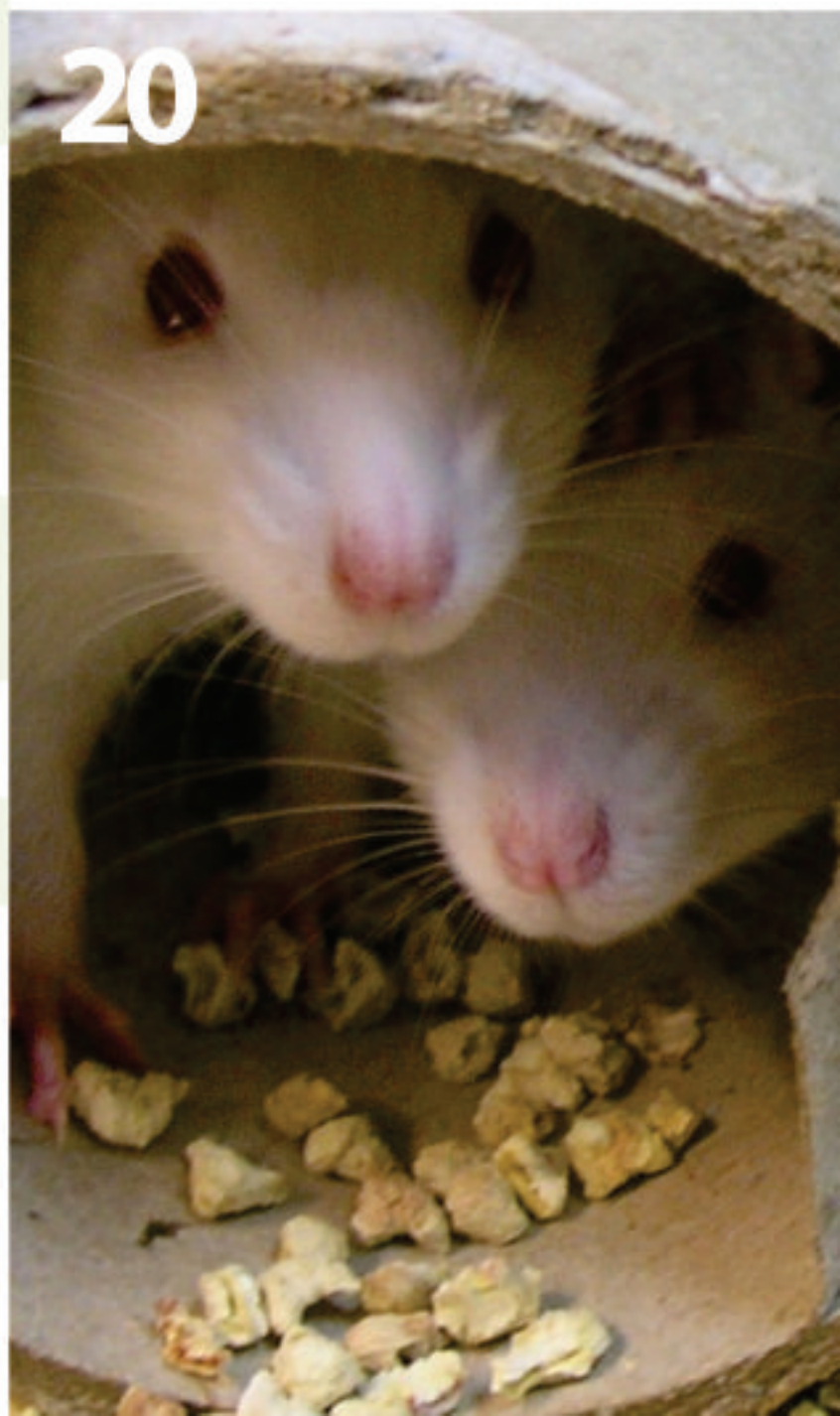
- Y...¿Para cuándo dice que los necesita?

50 ENTREVISTA

- Violeta Solís Soto.

53 CRUSECAL

20



EDITORIAL

El bienestar animal

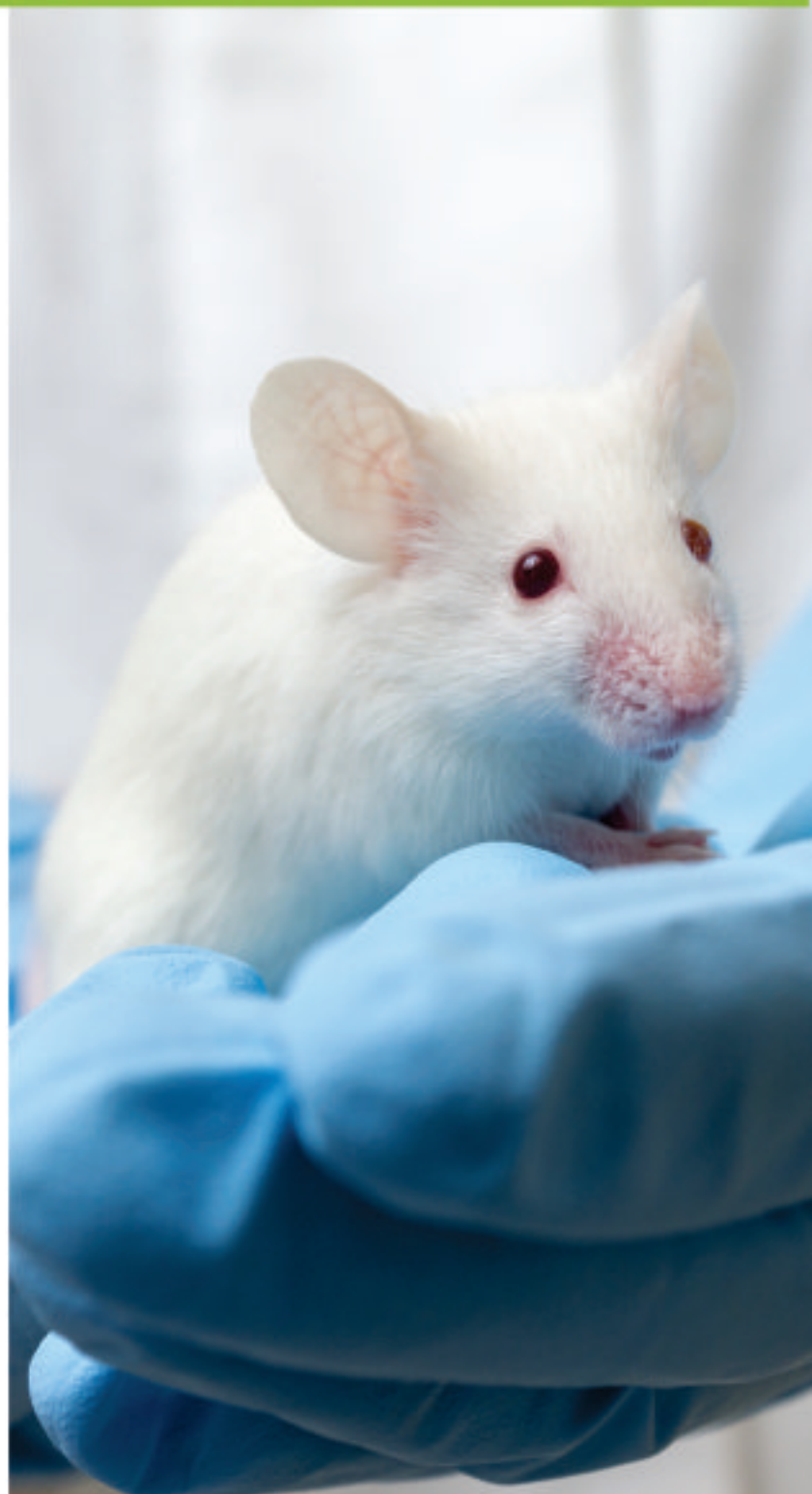
La preocupación por el bienestar animal no es contemporánea. Aunque en un entorno religioso, podemos encontrar vestigios de ella en la cultura del valle del Indo (civilización de la Edad del Bronce que se desarrolló desde el año 3.300 al 1.300 a.C. en el continente indio), en la que se consideraba que los animales debían ser sacrificados con el mismo respeto que se le debía a un humano. También la encontramos reflejada en la religión jainista (creada en la India en el siglo VI a.C.), que enfatiza una perspectiva igualitaria de las almas, independientemente de su forma física, y que por tanto abarca a humanos, animales y organismos vivientes microscópicos.

Aunque también hubo épocas en las que se negaba que los animales pudieran sentir cualquier cosa o que tuviesen intereses (por ejemplo, durante el cartesianismo), actualmente nadie duda que los animales son seres sensibles y que deben tenerse en cuenta las exigencias de su bienestar.

Ya en 1822, el parlamentario británico Richard Martin propuso un proyecto de ley que ofrecía protección de la crueldad a los bovinos, caballos y ovejas (que le valió el sobrenombre de *Humanity Dick*). En 1979, el gobierno del Reino Unido creó el *Farm Animal Welfare Council* (Concilio sobre el Bienestar de los Animales de Granja), que posteriormente elaboró unas directrices conocidas actualmente como las Cinco Libertades del Bienestar Animal: 1) libres de hambre y sed; 2) libres de incomodidad; 3) libres de dolor, lesiones y enfermedad; 4) libres para poder expresar un patrón de comportamiento normal; y 5) libres de miedo y angustia.

Desde entonces ha habido un interés creciente en promover el bienestar de los animales a partir de argumentos científicos, elaborando normas y directrices basadas en estos criterios y promoviendo la formación continua del personal. Aunque se ha avanzado mucho, el bienestar animal continúa siendo uno de los ejes centrales de la Ciencia del Animal de Laboratorio.

Dirección Revista SECAL



El pez cebra como modelo válido de investigación del virus del ébola y el dengue

Un trabajo del CSIC muestra que la transparencia de estos peces facilita la observación de la respuesta inmune celular. El uso de esta técnica para el estudio de patógenos, virus o bacterias puede contribuir a lograr dianas terapéuticas.

Las infecciones hemorrágicas virales se distribuyen en todo el mundo con importantes patógenos, con ejemplos como el ébola o el dengue. Los mecanismos de infección de los virus hemorrágicos son muy diversos y la falta de un organismo modelo para el estudio de la infección *in vivo* ha limitado la investigación de la patogénesis viral, y por tanto el conocimiento de la enfermedad.

Un equipo de investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ha mostrado que el pez cebra puede servir como modelo para investigar patógenos y enfermedades.

El estudio que se publica en la revista *Journal of Virology*, demuestra el potencial del pez cebra (*Danio rerio*), cada vez más empleado en el campo de la biomedicina.

« Los investigadores han podido analizar cómo el virus genera una respuesta inflamatoria en los peces desde los primeros momentos; y gracias a la transparencia de estos peces se ha podido observar por primera vez, con claridad, procesos de gran importancia durante la respuesta inmune a nivel celular. »

La mayoría de las investigaciones sobre las interacciones entre virus y células huésped se han realizado en líneas celulares que podrían no ser los principales objetivos durante las infecciones naturales.

El uso de este modelo animal con otros patógenos podría mejorar el conocimiento actual de las interacciones huésped-patógeno y aumentar el potencial para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas contra diversas enfermedades virales.

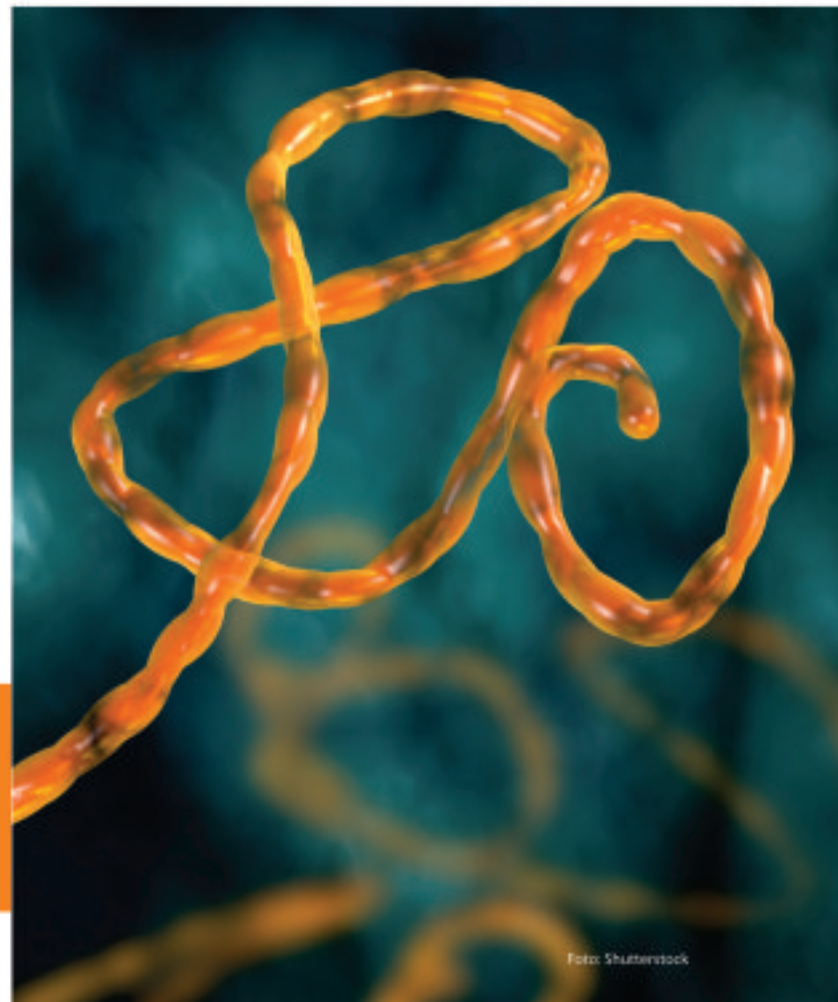


Foto: Shutterstock

<http://www.madrimasd.org/informacionidi/noticias/noticia.asp?id=61454>

<http://www.csic.es/prensa>

M. Varela, A. Romero, S. Dias, M. van der Vaart, A. Figueras, et al. *Cellular Visualization of Macrophage Pyroptosis and IL1 β Release in a Viral Hemorrhagic Infection in Zebrafish Larvae*. *Journal of Virology*. doi:10.1128/JVI.02056-14.

El ejercicio protege el cerebro de la depresión por estrés

El ejercicio físico tiene muchos efectos beneficiosos sobre la salud, incluyendo la protección contra la depresión inducida por el estrés, pero hasta ahora se desconocían los mecanismos que median en este efecto protector.

«En un estudio en ratones, investigadores del Instituto Karolinska, en Suecia, muestran que el entrenamiento físico induce cambios en el músculo esquelético que pueden purgar la sangre de una sustancia que se acumula durante el estrés y es perjudicial para el cerebro.»

En términos neurobiológicos, todavía no se sabe qué es la depresión. En este estudio se ofrece una explicación sobre los cambios bioquímicos protectores inducidos por el ejercicio físico que impiden que el cerebro se dañe durante el estrés.

Se sabía que la proteína PGC-1 α 1 aumenta en el músculo esquelético con el ejercicio y media en el acondicionamiento muscular beneficioso en relación con la actividad física. En este estudio, publicado en la revista *Cell*, los investigadores utilizaron un ratón modificado genéticamente con altos niveles de PGC-1 α 1 en el músculo esquelético que muestra muchas características de los músculos bien entrenados, incluso sin hacer ejercicio.

Estos ratones y otros control fueron expuestos a un ambiente estresante, como ruidos fuertes, luces intermitentes y alteración del ritmo circadiano en intervalos irregulares. Tras cinco semanas

de estrés leve, los ratones control desarrollaron un comportamiento depresivo, mientras que los modificados genéticamente, con características musculares de estar bien entrenados, no presentaban síntomas depresivos.

La hipótesis inicial de investigación fue que el músculo entrenado producía una sustancia con efectos beneficiosos sobre el cerebro. En realidad lo que los investigadores encontraron fue lo contrario; el músculo bien entrenado produce una enzima que purga el cuerpo de sustancias nocivas.

Además descubrieron que los ratones con mayores niveles de PGC-1 α 1 en el músculo, también tenían niveles más altos de unas enzimas llamadas KAT, que convierten quinurenina, una sustancia formada durante el estrés, en ácido quinurénico, que no es capaz de pasar de la sangre al cerebro. No se conoce la función exacta de la quinurenina, pero se encuentran altos niveles de esta sustancia en pacientes con enfermedad mental.

En este estudio, los científicos demostraron que la administración de quinurenina a ratones control produjo comportamientos depresivos, mientras que los roedores con aumento de los niveles de PGC-1 α 1 en el músculo no se vieron afectados. De hecho, estos animales no muestran niveles elevados de quinurenina en la sangre, ya que las enzimas KAT en sus músculos bien entrenados se convierten rápidamente en ácido quinurénico, convirtiéndose en un mecanismo de protección.

Este trabajo podría abrir un nuevo principio farmacológico en el tratamiento de la depresión, intentando influir en la función del músculo esquelético en lugar de dirigirse directamente al cerebro.



<http://www.infosalus.com/salud-bienestar/noticia-ejercicio-protector-cerebro-depresion-estres-20140926092354.html>

L. Z. Agudelo, T. Femenia, F. Orhan, M. Forsmyr-Palmertz, M. Golny, et al. *Cellular Skeletal Muscle PGC-1 α 1 Modulates Kynurenine Metabolism and Mediates Resilience to Stress-Induced Depression*. *Cell* 2014, 159:33-45.

Un “interruptor” en el ratón inhibe el apetito

Recientemente, los científicos han descubierto que en el cerebro del ratón existe una pequeña red de células que es posible que activen o bloqueen el apetito. “Este fue un descubrimiento accidental” dijo David Anderson, científico principal del estudio publicado en *Nature Neuroscience*, que al tratar de activar las neuronas de un ratón que esperaba que activaran un comportamiento de temor o ansiedad, observó algo totalmente diferente.

Utilizaron una técnica denominada Optogenética, que requiere la manipulación genética de células específicas para que sean sensibles a la luz en una determinada longitud de onda, en este caso azul claro. Después se insertan cables de fibra óptica en el cerebro, y cuando la luz está encendida, las neuronas se pueden activar o desactivar.

« El experimento consistió en que a un ratón que estaba comiendo, se le enviaba una señal de luz a su cerebro; el ratón dejaba de comer y se alejaba, desinteresándose por el alimento. »

Una explicación de porqué los ratones dejaron de comer podría ser que estuvieran ansiosos o asustados, o también a que este grupo de neuronas se activa igualmente con sabores malos y “malestar visceral” (náuseas).

Finalmente, la conclusión a la que llegaron fue que este pequeño grupo de neuronas podría ser un centro de control del apetito, que inhiben ciertos comportamientos cuando están activas, y tienen el efecto contrario cuando están bloqueadas, usando otra longitud de onda de la luz. Como haría un conmutador.

La posibilidad de que los humanos tengamos una red de control del apetito en una ubicación similar en nuestro cerebro, permite plantear interesantes conexiones entre las emociones y el apetito, estrechamente vinculados a la amígdala. El apetito y las emociones están sin duda conectados, y la oportunidad de saber algo acerca de esas conexiones a nivel de los circuitos cerebrales es emocionante.

Este hallazgo podría ser importante en el tratamiento de los trastornos de la alimentación.



Foto: shutterstock

http://www.nytimes.com/2014/08/12/science/a-mouse-switch-turns-off-appetite.html?ref=science&_r=0

H. Cai, W. Haubensak, T.E. Anthony, and D.J. Anderson. *Central amygdala PKC-δ(+) neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals*. *Nat Neurosci* 2014, 17(9):1240-8. doi: 10.1038/nn.3767.

Ratones avatar para pacientes afectados de cáncer

En un laboratorio en Baltimore, se mantienen ratones *nude* que identifican individualmente a un humano que está luchando con un tipo de cáncer. Estos ratones son "avatares" cancerosos, en los que los tumores visibles bajo la piel provienen de pacientes reales. Los animales sirven como "tubos de ensayo" personalizados.

Los avatares cancerosos son parte de estudios más amplios en tumores humanos fuera del cuerpo.

En este sentido, se han creado moscas de la fruta que comparten las mismas mutaciones genéticas que tienen los pacientes. Otra tecnología, todavía en desarrollo, es capturar las células tumorales desde el torrente sanguíneo, hacerlas crecer y testarlas en cultivo. Intentan hacer crecer mini-órganos completos con un sistema inmunológico que coincide con el del paciente.

Don Ingber, director del *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering* de la Universidad de Harvard, dice que estos enfoques fuera-del-cuerpo se enfrentan a algunos retos. Las células de cáncer varían tanto que no es seguro que el tumor en el ratón sea el mismo que el del humano. Además, el sistema inmunológico está muy involucrado en la respuesta del cuerpo al cáncer, pero estos ratones carecen de sistema inmune.

No todos los injertos funcionan. En aproximadamente el 30 por ciento de los casos, se ha fracasado en el intento de hacer crecer el tumor de un paciente en ratones. Pero la mayor limitación a los avatares del cáncer es que los tumores crecen aproximadamente a la misma velocidad en el ratón que en el humano y por tanto, no es útil para los pacientes que necesitan ser tratados rápidamente, como suele ser el caso.

Se puede crear el avatar, pero en muchos casos se consigue más tarde de que el paciente tenga que empezar con el tratamiento.

« El procedimiento que se sigue es extirpar primero un pedazo de tumor de un paciente durante una cirugía o biopsia. Luego se injerta en la piel de un ratón inmunodeficiente, y debido a que estos roedores tienen las defensas disminuidas, el tumor humano es capaz de crecer. »



Foto: Shutterstock

<http://www.technologyreview.com/news/529901/a-mouse-with-the-same-cancer-as-you/>



INSTRUMENTACIÓN E INSTALACIONES CIENTÍFICAS

C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1
28021 MADRID
Teléfono: 91 710 95 47
Fax: 91 796 65 52
E-mail: steriltech@steriltech.net
www.steriltech.net

Proteja su Investigación de la Contaminación con la Tecnología Clarus™ Peróxido de Hidrógeno Vaporizado



- Totalmente escalable
- Libre de residuos
- Baja Temperatura
- Excelente compatibilidad de materiales



CLARUS™ Z
Especialmente diseñado para salas
▪ Salas hasta 500 m³



CLARUS™ C

- SAS Biológicos
- Salas hasta 350 m³
- Racks Ventilados
- Aisladores
- Lava-racks



CLARUS™ L

- Racks Ventilados
- Aisladores
- Incubadores de CO₂
- Lava-racks



BMT Iberia, s.l.
C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1
28021 MADRID
Teléfono: 91 7230347
Fax: 91 5054494
E-mail: bmtiberia@steriltech.net
www.bmtiberia.es

Esterilizadores a Vapor STERIVAP HP IL, VAKULAB, UNISTERI



Reconocimiento y valoración del dolor en animales de experimentación

Carlota Largo

Cirugía Experimental Hospital Universitario La Paz, Madrid

INTRODUCCIÓN

El compromiso del bienestar de los animales es una de las principales limitaciones de la experimentación animal y uno de los factores que más pueden acotarla es el dolor. Existe una obligación ética, científica y legal para minimizar el dolor que puedan sufrir los animales, a su vez limitada por la dificultad para reconocer dicho dolor. Resulta interesante indicar que este mismo problema también se produce en la especie humana cuando se trata de reconocer, y por tanto tratar apropiadamente, el dolor en los niños en edad pre-verbal (bebés). Éstos, como los animales de experimentación, no pueden expresar con palabras lo que les ocurre ni con qué intensidad.

El dolor, según la definición más aceptada propuesta por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), es una "experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a una lesión tisular real o potencial, o que puede describirse como tal daño". Cuando esta definición la extrapolamos a animales se considera "una experiencia sensorial aversiva producida por un daño tisular real o potencial, que provoca reacciones vegetativas y motoras protectoras, causa evitación aprendida, y puede modificar el comportamiento, incluido el social."

El dolor, es una experiencia compleja que engloba un componente sensorial nociceptivo, entendido éste como un "proceso neuronal mediante el que se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos para los tejidos", y un componente afectivo, subjetivo y emocional, asociado a respuestas autonómicas y al miedo. Podríamos decir que "el dolor no es sólo lo que uno siente sino lo que le hace sentir", y son esos sentimientos lo que originan el sufrimiento asociado al dolor (WSAVA, 2014). La combinación de ambos factores induce cambios en el comportamiento, y es la evaluación del mismo lo que actualmente proporciona la información más fidedigna de la presencia de dolor y su intensidad, pero también de la eficacia de la terapia analgésica. Desgraciadamente, no existen otros métodos más objetivos, pero de lo que no cabe duda es que si no somos capaces de reconocer el dolor difícilmente seremos

capaces de tratarlo adecuadamente. En este sentido, se afirma que el dolor que padece un animal es aquel que el observador percibe e indica, y si éste no detecta dolor en los animales no se planteará una terapia analgésica. A continuación indicaremos cuáles son los métodos de reconocimiento y valoración del dolor en animales basados en el estudio del comportamiento.

Tabla 1. Resumen de los principales signos de dolor agudo en las distintas especies

Ratón	Es frecuente el aislamiento, las mordeduras. Presentan piloerección, lomo arqueado, los ojos y el abdomen hundidos. Pueden presentar deshidratación y pérdida de peso.
Rata	Son frecuentes las vocalizaciones y peleas. Tienen tendencia al lamido. Se observa pérdida de peso, piloerección, posición arqueada, e hipotermia. Aparecen descargas pigmentadas alrededor de los ojos y orificios nasales.
Cobayos	Los animales tienden al alejamiento. Son frecuentes la vocalización y la ausencia de resistencia a la inmovilización. El pelaje aparece hirsuto. En casos extremos hay una ausencia de respuesta.
Jarbo	Pueden presentar un aspecto encorvado, pérdida de peso. En ocasiones sufren el síndrome de choque. Son frecuentes las estereotipias.
Conejo	Muestran poco el dolor. Se produce una disminución de la ingesta de agua y de alimentos, presión con la cabeza en la pared de la jaula, movimientos limitados. Puede tener fotosensibilidad aparente.
Perró	Son comunes el gemido y el aullido. La vocalización normalmente cesa cuando se reconforta al animal. Raras veces oculta la zona dolorosa. La postura arqueada es habitual en presencia de dolor abdominal. Puede temblar.
Gato	La vocalización es rara. Al acercarse o manipularlos pueden gruñir o realizar un ruido de sisao. Tienen a ocultarse en espacios cerrados y a ocultar la zona dolorosa, pero en este último caso actuando con normalidad. Otros signos de dolor intenso son un descenso de la actividad o del acicalamiento, postura arqueada y disociación del ambiente exterior. Pueden mostrarse agresivos al acercarse o al manipular el área dolorosa.
PNH	Señales claves: posición encorvada, ausencia de limpieza, rechazo de alimentos o de agua, aspecto desanimado.
Oveja	Son típicos la postura rígida y el rechazo a moverse.
Cerdo	Son características las vocalizaciones. La desaparición de comportamientos sociales normales pueden ser indicadores útiles del sufrimiento en el cerdo.
Reptiles	Pueden producirse estremecimientos y contracciones musculares, pérdida de peso y anorexia.
Peces	De difícil valoración. Pueden asociarse a alteraciones en la natación o movimientos operculares rápidos.

EL COMPORTAMIENTO COMO PARÁMETRO PARA EVALUAR EL DOLOR

El dolor desde el punto de vista de la percepción sensorial nociceptiva es similar, si no idéntico, en el hombre y en los animales. Compartimos vías neurales similares para el desarrollo, conducción y modulación del dolor, lo que apunta a que un estímulo o procedimiento que potencialmente cause dolor en el hombre, también lo va hacer en el animal. De forma análoga, el empleo de analgésicos en los animales alivia el dolor o las manifestaciones asociadas al mismo.

La existencia de un componente emocional en la percepción dolorosa, aceptado en el hombre y de una forma cada vez más clara en los animales (Johansen, 2001), explica la elevada variabilidad individual a la hora de experimentar un mismo estímulo doloroso. Estados de ansiedad o depresión nos predisponen de forma negativa a la hora de percibir diversos estímulos. Este estado "pesimista" también se ha descrito en ratas que se han sometido a una estabulación en condiciones impredecibles (Harding, 2004), o a una actividad estresante previa a la cirugía (Clark, 2011).

El reconocimiento del dolor resulta difícil dado que carecemos de elementos o herramientas de medida objetivas y eficaces que no dependan de la interpretación personal que el observador haga de los comportamientos observados en los animales (Robertson, 2008). Además, los signos asociados al dolor en las distintas especies pueden diferir totalmente de los que presenta el ser humano, lo que hace que sea aún más difícil de valorar adecuadamente, y por tanto aumenta la subjetividad. El propósito que se plantea es cómo objetivar la evaluación del dolor basado en un sistema subjetivo como es la valoración del comportamiento.

HERRAMIENTAS EN EL RECONOCIMIENTO DEL DOLOR: ESCALAS DE VALORACIÓN

Para la evaluación del comportamiento es imprescindible un conocimiento previo de las características etológicas de la especie, es decir, del comportamiento normal de la misma. Además, el tipo de procedimiento (cirugía torácica vs. inoculación subcutánea) y el tejido afectado, que presente mayor o menor sensibilidad al dolor (ojos vs. hueso) nos permite establecer *a priori*, la severidad del procedimiento. Este principio de analogía es un buen punto de partida, pero para la evaluación del dolor durante (Intra) y después (Post-) del procedimiento, es necesario disponer de sistemas de valoración más objetivos y fiables.

Escalas de valoración de dolor

Las primeras escalas desarrolladas son relativamente simples e incluye la *escala analógica visual* en la que el animal es observado durante un breve periodo (p.ej. 5 minutos), y el observador marca el punto en una línea de 100mm en cuyos extremos se representa la ausencia de dolor (a la izquierda: estado normal), y el máximo dolor posible (a la derecha). El valor se traslada a un valor de 0 a 100. La serie de vídeos demostrativos realizada por el grupo de Paul Flecknell de la Universidad de Newcastle emplea esta escala.

Ausencia de dolor ——— X ——— Dolor extremo

La *escala descriptiva simple* asocia una descripción (categoría) al comportamiento observado. Estas escalas son similares a la categorización de la severidad, pero restringida solamente a la evaluación del dolor. Un ejemplo podría ser la siguiente escala:

- Sin dolor
- Dolor leve con manifestaciones poco evidentes (mediante palpación)
- Dolor moderado con alteraciones igualmente moderadas pero claras del comportamiento y la fisiología
- Dolor intenso con alteraciones muy evidentes del comportamiento y la fisiología
- Dolor insoportable con manifestaciones violentas y continuas

En la *escala numérica* se asigna un valor numérico al comportamiento, pero es importante destacar que la diferente numeración y su valor no refleja necesariamente el peso de cada categoría; es decir, una puntuación de cuatro no implica el doble de dolor que si fuera dos. La siguiente escala es un ejemplo de escala numérica (adaptada de Conzemius, 1997).

Observación	Puntos	Criterio
Vocalización	0	No vocaliza
	1	Vocaliza, responde a una voz calmada y a caricias
	2	Vocaliza, no responde a una voz calmada ni a caricias
Movimiento	0	Ninguno
	1	Cambios frecuentes de posición
	2	Se retuerce
Agitación	0	Adormilado o calmado
	1	Agitación leve
	2	Agitación moderada
	3	Agitación severa

Las *escalas multiparamétricas o complejas* combinan la evaluación individual de distintos parámetros (p.ej. peso, movilidad, respuesta frente a estímulos, etc.). La repercusión de cada uno de estos parámetros también es variable, y la valoración final resulta de la suma de la puntuación de cada uno de ellos por separado. Este tipo de escala tiene como ventaja que es más 'objetiva', y como principal inconveniente la correcta elección de los parámetros a evaluar. Estas escalas han sido desarrolladas fundamentalmente para las especies canina (escala de Glasgow y de Melbourne - Firth, 1999; Murrell, 2008) y felina (escala MCPS - Brondani, 2013), y en algunos casos han sido validadas (escalas de Glasgow y MCPS). Este factor es relevante porque implica que se obtienen resultados equivalentes independientemente de la persona que realice la valoración, es decir, eliminan en gran medida el factor 'observador'. Desgraciadamente, no existen escalas validadas para su empleo en otras especies. Un ejemplo de escala de dolor de Glasgow puede encontrarse en www.doloranimal.org/fdocum/2008-murrell/175.html.

Comportamientos asociados a dolor en roedores

El grupo de P. Flecknell ha realizado numerosos estudios que incluyen la identificación de los comportamientos que se asocian con mayor frecuencia a situaciones de dolor, como tras una laparotomía. A partir de estos estudios establecieron una escala de valoración basada en cinco comportamientos principales: contracción músculo-cutánea de la piel del dorso, arqueamiento, caídas, lamido de la herida y contracción de la pared abdominal (Roughan, 2001). Posteriormente demostraron su eficacia para detectar distintas dosis de analgésicos, siendo más eficaz que una escala analógica visual ya que se evita la subjetividad asociada al observador (Wright-Williams, 2007). Los mismos autores han desarrollado un recurso formativo basado en la visualización de vídeos en ratas para la formación del personal investigador. Dicho recurso puede descargarse directamente de la web (www.digires.co.uk) a un coste simbólico.

Escalas de valoración del dolor basadas en la expresión facial

Aunque desde hace años existen escalas de valoración del dolor en bebés que se utilizan habitualmente en el ámbito hospitalario (escala LLANTO, Hospital La Paz, Madrid - Reinoso-Barbero, 2011), no ha sido hasta hace muy poco cuando unos investigadores comprobaron que los roedores pueden mostrar cambios similares en la expresión facial en situaciones que provocan dolor. Los mismos elaboraron una escala basada en cinco comportamientos faciales: grado de apertura orbital, abultamiento de la nariz, abultamiento de las mejillas, posición de

las orejas y cambios en la posición de las vibrisas. A cada una de ellas se le asigna un valor numérico de 0: ausencia dolor; 1: moderado y 2: elevado (Langford, 2010). Estas escalas han sido de gran utilidad en la evaluación de drogas analgésicas, ya que existen comportamientos de los roedores que, si bien pueden correlacionarse en el tiempo con daños que presumiblemente generan dolor, es difícil demostrar que son específicos y suficientemente sensibles como medidas de dolor (Mogil, 2010). La escala ha sido aplicada con éxito en la rata (Sotocinal, 2011), el conejo (Keating, 2012) o el caballo (Dalla Costa, 2014). Actualmente, se está trabajando en sistemas de valoración automatizada del comportamiento para determinar el grado de dolor, aunque todavía no han sido validados y comercializados (Sotocinal, 2011).

OTROS SISTEMAS DE VALORACIÓN DEL DOLOR NO OBSERVACIONALES

Sin duda la disponibilidad de sistemas de valoración del dolor no basados en el comportamiento podría conferir un menor grado de subjetividad, pero hasta la fecha o no existen dichos métodos, o éstos no son más eficaces. Entre los métodos de valoración del dolor no se consideran los empleados en estudios de evaluación de umbrales nociceptivos mecánicos (test de von Frey, Randall-Selitto) o térmicos (Tail flick, placa caliente) dado que éstos no resultan prácticos para su uso en los diferentes modelos empleados en investigación. En los últimos años se han descrito equipos electrónicos de valoración del dolor como el Painmouse (Schaffner, 2012) que valora umbrales mecánicos. Otros equipos asumen la relación entre el dolor y el equilibrio de los sistemas simpático y parasimpático, que puede evidenciarse mediante la variabilidad en los patrones de electrocardiograma. En cualquier caso, estos dispositivos se hayan todavía en periodo de desarrollo o evaluación en personas, y no existen datos que permitan su aplicación en animales.

CONCLUSIONES

Sólo trataremos correctamente el dolor si podemos valorarlo. Actualmente los métodos de valoración más fiables son los basados en el comportamiento. Desgraciadamente, el comportamiento tiene un marcado componente de especie y requiere experiencia en el mismo. Existen comportamientos típicamente, pero no exclusivamente en muchos casos, asociados al dolor que pueden emplearse en sistemas o escalas de valoración del dolor. Independientemente de sus limitaciones, ello supone un gran avance ya que permite establecer una valoración, por muy subjetiva que ésta sea. Recientemente, se ha

demostrado otro sistema de valoración mediante la expresión facial y existen estudios prometedores sobre su eficacia, pero no de su aplicación práctica en el laboratorio de investigación. Actualmente, los sistemas de evaluación del dolor basados en el comportamiento siguen siendo los más fiables para poder mejorar las terapias analgésicas de los animales de experimentación y mejorar su bienestar.

BIBLIOGRAFÍA

La mayoría de las referencias bibliográficas o enlaces pueden encontrarse en la web del dolor: www.doloranimal.org.

Un tutorial sobre la valoración del dolor en ratas puede obtenerse en www.digires.co.uk/product/pain-assessment-in-the-rat.

- Breivik H, Borchgrevink P.C., Allen S.M., et al. Assessment of pain. *Br. J. Anaesth.* 2008, 101(1):17-24. doi:10.1093/bja/aen103
- Brandani J.T., Mama K.R., Luna S.P., et al. Validation of the English version of the UNESP-Botucatu multidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cats. *BMC Vet Res* 2013, 9: 143. doi:10.1186/1746-6148-9-143
- Clark C., Mendl M., Jamieson J., et al. Do psychological and physiological stressors alter the acute pain response to castration and tail docking in lambs? *Vet Anaesth Analg* 2011, 38(2): 134-45. doi: 10.1111/j.1467-995.2011.00594.x.
- Dalla Costa E., Minero M., Lebelt D., et al. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. *PLoS ONE* 2014, 9(13): e92281. doi:10.1371/journal.pone.0092281
- Firth A.M. and Haldane S.L. Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs. *JAVMA* 1999, 214:652-59.
- Harding E.J., Paul E.S., and Mendl M. Animal behaviour: Cognitive bias and affective state. *Nature* 2004, 427: 312.
- Johansen J.P., Fields H.L., and Manning B.H. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci Usa* 2001, 98:8077-82.
- Keating S.C.J., Thomas A.A., Flecknell P.A., et al. Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. *PLoS ONE* 2012, 7(9):e44437. doi:10.1371/journal.pone.0044437
- Langford D.J., Bailey A.L., Chanda M.L., et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods* 2010, 7: 447-9.
- Leach M., Kraus K., Miller A., et al. The assessment of Post-Vasectomy pain in mice using behaviour and de Mouse Grimace Scale. *PLoS ONE* 2012, 7(4):e35656. doi:10.1371/journal.pone0035656
- Mogil J.S., Graham A.C., Ritchie J., et al. Hypoalocromia, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. *Mol Pain* 2010, 6:34.
- Murrell J.C., Psatha E.P., Scott E.M., et al. Application of a modified form of the Glasgow pain scale in a veterinary teaching centre in the Netherlands. *Vet Rec* 2008, 162(13):403-8.
- NRC [National Research Council] 1996. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 7th ed. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Reinoso-Barbero F., Lahoz Ramón A.I., Durán Fuente M.P., et al. Escala LLANTO: instrumento español de medición del dolor agudo en la edad preescolar. *An Pediatr* 2011, 74 (1): 10-4. doi: 10.1016/j.anpedi.2010.08.005
- Robertson S. Managing pain in feline patients. *Vet Clin North Am - Small Anim* 2008, 38: 1267-90.
- Roughan J.V. and Flecknell P.A. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 2001, 90: 65-74.
- Schaffner N., Folkers G., Käppeli S., et al. A New Tool for Real-Time Pain Assessment in Experimental and Clinical Environments. *PLoS ONE* 2012, 7(11):e51014. doi:10.1371/journal.pone.0051014
- Sotocinal S., Sorge R., Zalau A., et al. The rat grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain* 2011, 7:55. doi: 10.1186/1744-8069-7-55
- Wright-Williams S.L., Courade J.P., Richardson C.A., et al. Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* 2007, 130: 108-18.
- Mathews K., Kronen P.W., Lascelles D., et al. Guidelines for Recognition, Assessment and Treatment of Pain. *Journal of Small Animal Practice* 2014, 55:E10-E68. doi:10.1111/jsap.12200

Estás a un clic 

de navegar en nuestro sitio web,
donde encontrarás información de
las ciencias del animal de laboratorio
www.secal.es



 sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Un humor de ratas, o cómo saber cómo se sienten mis animales

Violeta Solís Soto

Laboratory Animal Sciences, GlaxoSmithKline I+D, Parque Tecnológico de Madrid

El bienestar animal es la base sobre la que gira el universo del animal del laboratorio en estos momentos. Ha llevado su tiempo llegar hasta aquí, pero no hay especialista que no reconozca su relevancia; se trata de un requisito imprescindible para la actividad en las ciencias del animal de laboratorio ya sea desde el punto de vista científico, ético o legal.

Sin embargo, diferentes profesionales pueden tener diferentes concepciones de lo que es relevante para el bienestar, puesto que hay numerosos factores que intervienen en el mismo. A menudo se le da prioridad a parámetros "físicos" relativos a la salud del animal, fundamentalmente por motivos prácticos: son parámetros que pueden medirse con mayor facilidad y menor consumo de tiempo, y que se consideran más objetivos que otras variables. Con todo, algunos autores defienden que el bienestar depende únicamente de cómo "se siente" el animal, por lo que lo relevante no es si tiene una infección o pierde peso, sino si se siente mal, aunque a menudo pueda coincidir [1].

Aunque consideremos que la ausencia de enfermedad es muy importante para un adecuado bienestar, ¿nos preocuparíamos por nuestros animales si tuviéramos la certeza de que éstos reaccionan de forma automática ante los estímulos, sin llegar a procesarlos y por tanto, sin llegar a sentir nada? Esta es la razón que nos lleva a preocuparnos más por el bienestar de un primate que por el de un ratón, por ejemplo. Así, la protección a los animales de investigación ha empezado por los vertebrados y se ha extendido a los cefalópodos según hemos sabido más de sus capacidades cognitivas. Lo importante es que los animales sean seres capaces de sentir, que sean seres "sentientes".¹

Para Charles Darwin, la capacidad de sentir de los animales era obvia y no necesitaba argumentación. Clasificó las diferentes emociones haciendo hincapié en la continuidad evolutiva entre los humanos y otros animales, y dando por sentado que los segundos no sólo se comportan de manera emocional, sino que experimentan esas emociones [2]. Sin embargo, durante décadas la opinión científica general ha defendido que aunque pudiéramos observar su conducta, nunca podríamos saber cómo

se sienten realmente los animales. Fue Marian Stamp Dawkins la pionera en romper esta creencia utilizando técnicas de análisis de la motivación [3]. Más adelante, los neurocientíficos llegaron en su ayuda para confirmar lo que Darwin ya sabía: que los animales son capaces de sentir. Los estados de felicidad y tristeza, así como otros estados afectivos básicos, dependen en gran medida de estructuras cerebrales que compartimos con los demás mamíferos [4].

Las medidas físicas de bienestar tienen un inconveniente adicional: nos permiten detectar estados de ausencia de malestar, pero no la existencia de bienestar. Actualmente aspiramos no sólo a que los animales estén sanos y no sufran dolor, sino que además puedan tener un estado de ánimo positivo, que sean "felices". Esto es particularmente relevante en el campo de la investigación biomédica, ya que a menudo nuestro trabajo genera situaciones de malestar que son difícilmente evitables, especialmente cuando estudiamos enfermedades graves. De esta manera, no vamos a poder proporcionar a nuestros animales un bienestar basado en la salud, sino que nos vamos a tener que centrar en evitar que ésta dé lugar a estados afectivos negativos. Es algo que ya venimos haciendo con el uso de técnicas tan habituales y eficaces como la anestesia y la analgesia.

Podemos acercarnos al mundo afectivo de nuestros animales observando su conducta espontánea y mediante pruebas empíricas, como las de preferencia y motivación, automedicación y sesgo cognitivo, que veremos a continuación.

Observación de la conducta espontánea del animal

La observación de la conducta espontánea de nuestros animales puede informarnos de situaciones negativas como el miedo, o positivas como el juego. Para ello es necesario tener un buen conocimiento de lo que es la conducta normal de la especie con la que estamos trabajando. El etograma² nos ayuda a conocer mejor las conductas normales y las anormales, indicativas de problemas de bienestar. Un etograma exhaustivo del ratón puede encontrarse en: www.mousebehavior.org

¹Según el diccionario de la Real Academia Española, *sentiente*, *sentiente* 'que siente'.

²Listado de las conductas de una especie con sus definiciones correspondientes.

La neurociencia defiende la existencia de siete sistemas emocionales básicos (entre los que se encuentra el miedo), que se concentran en regiones subcorticales del cerebro de todos los mamíferos, y cuya existencia tiene un significado biológico al favorecer la supervivencia del individuo [5]. Las conductas indicativas de estrés, miedo y dolor en las especies más comúnmente utilizadas en el laboratorio pueden encontrarse descritas en numerosos tratados [6] por lo que no se van a comentar aquí. Sin embargo, es imprescindible mencionar el reciente descubrimiento de la expresión facial de dolor en animales, que resulta una herramienta fantástica para la identificación del dolor agudo (explicado en el artículo de Carlota Largo, también en este número).

Vocalizaciones

Las vocalizaciones en los animales pueden indicar diferentes estados afectivos. En el caso de los roedores, la mayor parte pueden pasar desapercibidas al emitirse en un rango inaudible para el ser humano. Las vocalizaciones en el rango de los 22-28 kHz en la rata se asocian a estrés o dolor [7] y pueden escucharse con un detector de murciélagos (ver Figura 1), lo que permite identificar situaciones en las que el animal puede sufrir malestar, como tras una cirugía.

La rata produce además vocalizaciones que indican estados afectivos positivos. Estas vocalizaciones se sitúan alrededor de los 50 kHz y se producen durante el juego en individuos juveniles o cuando los investigadores les hacen "cosquillas", por lo que se han considerado una forma primitiva de risa [8]. Se producen con mayor frecuencia cuando los animales anticipan una oportunidad de juego, lo que llevó a proponer su uso para medir experiencias afectivas positivas. Pueden escucharse ambas vocalizaciones en www.humane-endpoints.info.

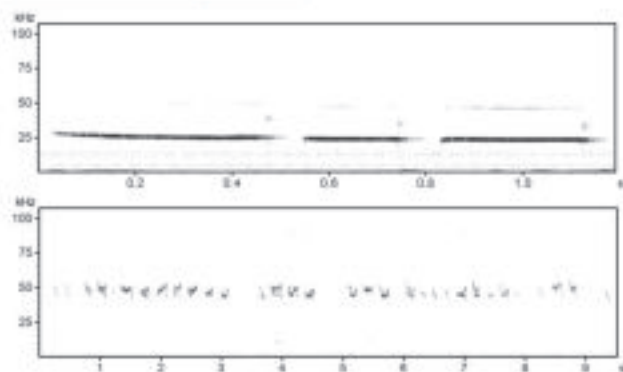


Figura 1.- Espectrogramas de las vocalizaciones de la rata. Arriba, vocalizaciones de 22 kHz, negativas, que se emiten en pulsos largos. Abajo, vocalizaciones de 50 kHz, positivas y de corta duración, similares a un "gorjeo". Fuente: www.axisoft.com.

Así, se ha propuesto el uso de las "cosquillas" para la mejora del bienestar de las ratas. Por ejemplo, hacerles cosquillas antes y después de una inyección intraperitoneal produce un aumento de las vocalizaciones de 50 kHz y una reducción de las vocalizaciones audibles (negativas), así como una reducción del tiempo necesario para el procedimiento, especialmente si las ratas tienen experiencia previa en la manipulación con "cosquillas" durante la etapa juvenil [9]. La habituación a la manipulación y al contacto humano parece ser más eficaz cuando se realiza mediante el uso de "cosquillas" [10], que pueden ser también beneficiosas para contrarrestar los efectos negativos del alojamiento individual [11].

En el caso del ratón, no existen -o no se conocen- vocalizaciones que nos indiquen estados afectivos de forma similar a las de rata [7]. Los ratones pueden vocalizar tanto mediante ultrasonidos como en el rango audible, en respuesta a procedimientos dolorosos, pero en una proporción tan baja que no permite su utilización para la evaluación del dolor [12]. En cambio, sí que emiten vocalizaciones sociales ultrasónicas durante el cortejo y también en situaciones no agresivas. Estas últimas parecen ser similares a las vocalizaciones de 50 kHz en la rata, aunque únicamente en el contexto social intraespecífico [13].

Pruebas de preferencia y motivación

Podría decirse que las pruebas de preferencia y motivación nos permiten preguntar a los animales qué cosas son importantes o desagradables para ellos. Cuando un animal muestra una fuerte motivación por conseguir o evitar algo, podemos asumir que su bienestar se verá afectado si no puede hacerlo [14].

Las pruebas de preferencia se han utilizado para establecer las preferencias de los animales por diferentes aspectos de alojamiento. Sin embargo, no nos indican hasta qué punto las preferencias son significativas para el animal (es decir, si afectan a su bienestar), por lo que esto último también se debe evaluar [15]. Por ejemplo, la relevancia de la preferencia de los ratones por el material de nido (pañuelos de papel) frente a una caja-nido metálica se pudo confirmar al asociar un estímulo negativo (suelo de rejilla) al primero y observar que los ratones seguían prefiriendo la jaula en la que estaba el material de nido [16].

Otra manera de estudiar la relevancia de las preferencias es utilizar las pruebas de motivación que evalúan el esfuerzo que el animal está dispuesto a realizar por alcanzar un recurso. Aquellos recursos que el animal siga demandando, aunque aumente el esfuerzo que tenga que hacer para conseguir acceso a ellos, se

consideran relevantes. El esfuerzo por un recurso puede compararse también con el que esté dispuesto a realizar por otros y así, determinar su relevancia relativa. Por ejemplo, podemos suponer que la compañía de individuos conocidos para una rata es importante cuando observamos que el esfuerzo que realiza prácticamente duplica el que haría por entrar en una jaula grande o con enriquecimiento ambiental [17]. Para ello, se entrenó a unas ratas a presionar una palanca para acceder a cada uno de los recursos; una vez aprendido esto, se aumentó gradualmente el número de presiones requeridas hasta que el animal dejó de responder. Las ratas presionaron la palanca hasta 73 veces para acceder a la compañía de sus congéneres, mientras que no superaron las 41 para acceder a cualquiera de los otros recursos.

También existen pruebas de motivación similares a las anteriores, pero que evalúan la motivación de los animales por evitar o huir de situaciones o estímulos que son potencialmente desagradables para ellos; son las pruebas de "aversión". Se han utilizado, por ejemplo, para medir la aversión de la rata y el ratón a los diferentes gases utilizados para la eutanasia, como el CO₂, el argón, o una mezcla de ambos [18]. Este estudio midió el tiempo que tardaron los animales en salir de una cámara con dichos gases y el tiempo total pasado en la cámara, en comparación con otra que contenía únicamente aire. Ratas y ratones mostraron una marcada aversión al CO₂ y sus mezclas, por lo que los autores concluyeron que su uso para la inducción de la eutanasia era inaceptable y que sólo debería utilizarse como eutanásico si se aplica una sedación previa.

Pruebas de automedicación

Las pruebas de automedicación nos indican la capacidad de los animales de sentir dolor o ansiedad y de su motivación para aprender a reducir dichos estados.

El primero de estos estudios se realizó en la década de los ochenta sobre la autoadministración de analgesia en ratas con artritis [19]. Tras inducir artritis a las ratas, se las dejó elegir entre beber de un biberón que contenía una solución azucarada, o de otro que contenía un analgésico. Mientras las ratas no presentaron inflamación – o fueron controles – la preferencia por la solución azucarada fue clara. Sin embargo, en el grupo experimental el consumo de analgésico aumentó significativamente y a la par con la inflamación. Esto muestra que el dolor para estas ratas suponía algo negativo, y que era lo suficientemente relevante para ellas como para aprender que un determinado líquido les aliviaba el dolor, aunque supusiera renunciar al consumo del fluido azucarado que preferirían en circunstancias normales.

Esta misma metodología se ha utilizado para estudiar el estado afectivo de los ratones mediante la autoadministración de un ansiolítico [20]. En este caso, había tres grupos: 1) control, sin enriquecimiento ambiental; 2) estresado, sometido a cambios en la posición y en la inclinación de la jaula; y 3) enriquecido, con enriquecimiento ambiental. Cuando se les dio a elegir entre beber de un biberón con agua o de otro con un ansiolítico, los dos primeros grupos bebieron más ansiolítico que los animales con enriquecimiento. Además, tanto los controles como los "estresados" bebieron más ansiolítico cuando el biberón estuvo colocado en la parte posterior de la jaula, más protegida. Como en el estudio anterior, este trabajo nos muestra la capacidad de los animales para aprender que el consumo del líquido procedente de uno de los biberones les hace sentir mejor. Además, revela que los animales alojados en condiciones empobrecidas (los controles) no sólo no son "normales" en cuanto al grado de ansiedad que presentan, sino que tienen una conducta más cercana a la de los animales estresados, lo que cuestiona su validez como animales de referencia.

Pruebas de sesgo cognitivo

El sesgo cognitivo es otro de los aspectos característicos de la depresión que puede utilizarse para valorar el estado de ánimo de los animales. En determinadas circunstancias, podemos encontrar con animales que están menos activos de lo normal, o que no muestran curiosidad por su entorno. Éste sería un indicador de que no se encuentran bien, ya sea física o anímicamente, y en algunos casos podría tratarse del equivalente no humano de la depresión. Sería incoherente pensar que esta situación no se pueda dar en animales, ya que los utilizamos para probar fármacos antidepresivos en modelos de diferentes aspectos de la depresión, como la indefensión aprendida (prueba de la natación forzada [21]) o la anhedonia¹ [22]. Por ejemplo, en un modelo animal de estrés social crónico en la rata [23], se observaron cambios indicativos en diferentes aspectos relacionados con la depresión: 1) reducción de la actividad general y exploratoria; 2) reducción del consumo de una solución azucarada (indicativo de anhedonia); 3) aumento de la inmovilidad en la prueba de natación forzada; y 4) reducción de la ganancia de peso corporal y aumento del peso de las glándulas suprarrenales.

En el ser humano se sabe que el procesamiento de la información puede verse afectado por las emociones del individuo, es lo que se denomina "sesgo cognitivo", una versión

¹Incapacidad para experimentar placer y pérdida de interés o satisfacción en las actividades que antes resultaban interesantes (adaptado de [25]).

científica del vaso medio lleno o medio vacío. Así, ante estímulos ambiguos, un individuo con un estado de ánimo negativo tenderá a tomar decisiones pesimistas y otro con un estado de ánimo positivo, optimistas. La existencia de sesgo cognitivo en ratas se ha demostrado en un experimento en el que aprendieron que presionar una palanca, tras un tono concreto, daba lugar a una recompensa, y presionarla tras otro diferente, a un castigo. La fase de prueba empezó cuando las ratas tuvieron que decidir entre presionar o no la palanca tras oír tonos intermedios entre ambos. Las ratas estresadas experimentalmente respondieron menos a los tonos intermedios y cuando lo hicieron, tardaron más en tomar una decisión, mostrando un sesgo cognitivo pesimista [24].

El sesgo cognitivo es, por tanto, una herramienta muy útil como indicador del estado afectivo de los animales en estudios de bienestar animal, y así se ha utilizado para demostrar el impacto emocional positivo que tiene el enriquecimiento ambiental en la rata [26]. En este caso, en vez de utilizar un premio y un castigo se utilizaron dos premios, siendo uno ellos claramente preferido por las ratas (chocolate frente a cereal). Además, las ratas asociaron cada uno de los premios (escondidos en una arena en boles diferentes) a la presencia de lija de grano fino o grueso en el acceso al recinto en el que estaban los premios. Luego debían elegir a qué bol acudir cuando el papel de lija era de grano intermedio (estímulo ambiguo). Todas las ratas respondieron de manera similar, pero cuando a un grupo de ellas se las alojó con enriquecimiento ambiental, comenzaron a responder de forma más "optimista" al acudir más a menudo al bol en el que se encontraba el premio preferido (ver Figura 2).

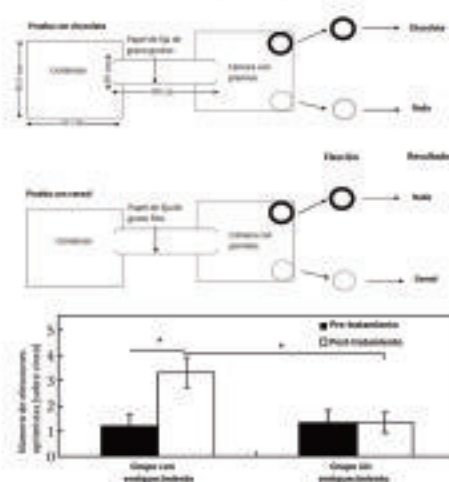


Figura 2.- Planteamiento experimental para estudiar el cambio en el sesgo cognitivo en ratas alojadas con enriquecimiento ambiental (arriba), y gráfica mostrando el incremento en elecciones positivas tras el alojamiento con enriquecimiento ambiental (abajo). Adaptado de [26].

Recientemente, también se ha mostrado mediante esta técnica una posible mejora del estado afectivo de las ratas al aumentar la altura de la jaula hasta permitir una incorporación completa sobre las patas traseras [27]. Si se confirmara el hallazgo, sería un dato a tener en cuenta para próximas revisiones de las dimensiones de las jaulas de rata.



Figura 3.- Diferentes estudios muestran que el enriquecimiento ambiental puede mejorar el bienestar de los animales en experimentación. En las imágenes se muestran ejemplos en rata (arriba) y ratón (abajo).

Conclusión

La evaluación del bienestar animal comprende aspectos de salud, homeostasis, conducta y emociones. Estas últimas son fundamentales en los animales de laboratorio con objeto de proporcionar no sólo ausencia de malestar, sino situaciones reales de bienestar. Hemos visto aquí una serie de herramientas que nos ayudan a identificar los diferentes estados afectivos de los animales con los que trabajamos, así como el potencial del enriquecimiento ambiental en la reducción de la ansiedad y el aumento del sesgo cognitivo positivo. Todas estas herramientas nos ayudarán a asegurar que nuestros animales tengan una calidad de vida lo mejor posible, porque si - como hemos visto - son capaces de sentir dolor, miedo u optimismo de una forma tan similar a la nuestra... ¿cómo no vamos a hacerlo?

BIBLIOGRAFÍA

- Duncan I.J.H., et al. *The implications of cognitive processes for animal welfare.* *J Anim Sci* 1991, 69:5017-22.
- Dawkins M.S. *Through animal eyes: What behaviour tells us.* *Appl Anim Behav Sci* 2006, 100:4-10.
- Webster J. *Animal sentience and animal welfare: What is it to them and what is it to us?* *Appl Anim Behav Sci* 2006, 100:1-3.
- Burgdorf J., et al. *The neurobiology of positive emotions.* *Neurosci Biobehav R* 2006, 30:173-87.
- Panksepp J. *Affective consciousness: Core emotional feelings in animals and humans.* *Conscious Cogn* 2005, 14:30-80.
- Manteca Vilanova X., et al. *Bienestar. Necesidades fisiológicas y factores relacionados.* En: Zúñiga J.M., Orellana, J.M., y Tur J.A. (Eds.). *Ciencia y tecnología del animal de laboratorio UAH-SECAL*, 2008; 409-31.
- Whittaker A.L., et al. *Use of spontaneous behaviour measures to assess pain in laboratory rats and mice: How are we progressing?* *Appl Anim Behav Sci* 2014, 151:1-12.
- Panksepp J., et al. *"Laughing" rats and the evolutionary antecedents of human joy?* *Physiol Behav* 2003, 79:533-47.
- Cloutier S., et al. *The social buffering effect of playful handling on responses to repeated intraperitoneal injections in laboratory rats.* *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014, 53:168-73.
- Cloutier S., et al. *Playful handling by caretakers reduces fear of humans in the laboratory rat.* *Appl Anim Behav Sci* 2012, 140:161-71.
- Cloutier S., et al. *Playful handling as social enrichment for individually- and group-housed laboratory rats.* *Appl Anim Behav Sci* 2013, 143:85-95.
- Williams W.O., et al. *Ultrasonic sound as an indicator of acute pain in laboratory mice.* *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008, 47:8-10.
- Panksepp J., et al. *Affiliative behavior, ultrasonic communication and social reward are influenced by genetic variation in adolescent mice.* *PLoS ONE* 2007, 4:e351.
- Dawkins, M.S. *From an animal's point of view: motivation, fitness, and animal welfare.* *Behav. Brain Sci* 1990, 13:1-61.
- Fraser D., et al. *Preference and motivation testing.* In: Appleby M.C. y Hughes B.O. (Eds.). *Animal Welfare* 1997, 159-73.
- Van de Weerd H.A., et al. *Strength of preference for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice.* *Appl Anim Behav Sci* 1998, 55:369-82.
- Patterson-Kane E.G., et al. *Rats demand social contact.* *Anim Welfare* 2002, 11:327-32.
- Leach M.C., et al. *Aversion to Gaseous Euthanasia Agents in Rats and Mice* *Comparative Medicine* 2002, 52:249-57.
- Colpaert F.C., et al. *Self-administration of the analgesic Suprofen in arthritic rats: evidence of Mycobacterium butyricum-induced arthritis as an experimental model of chronic pain.* *Life Sci* 1980, 27:921-28.
- Sherwin C.M., et al. *Housing conditions affect self-administration of anxiolytic by laboratory mice.* *Anim Welfare* 2004, 13:33-8.
- Porsolt R.D., et al. *Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments.* *Eur J Pharmacol* 1978, 47:379-91.
- Willner P., et al. *Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant.* *Psychopharmacology* 1987, 93:358-64.
- Rygula R., et al. *Anhedonia and motivational deficits in rats: Impact of chronic social stress.* *Behav Brain Res* 2005, 162:127-34.
- Harding E.J., et al. *Cognitive bias and affective state.* *Nature* 2004, 427:312.
- Martin Arias J.M. *Revisión de los términos del léxico psiquiátrico de la vigésima segunda edición del diccionario de la Real Academia Española y propuesta de nuevos lemas (primera entrega: A-C).* *Panace@* 2010, 12:4-18.
- Brydges N M., et al. *Environmental enrichment induces optimistic cognitive bias in rats.* *Anim Behav* 2011, 81:169-75.
- Hickman D., et al. *Multilevel caging enhances the welfare of rats as assessed by a spatial cognitive bias assay.* In: Waiblinger S., Winckler C. and Gutmann A. (Eds.). *46th Congress of the International Society for Applied Ethology, Vienna, Austria 2012* p. 91.





www.sodispan.com

email: sodispan@sodispan.com

teléfonos: 629 039 890 - 629 159 613



Dietas
Lechos y Virutas
Jaulas y Racks
Sistemas acuáticos

Equipos
Enriquecimiento
Distribución
Soporte técnico

AQUANEERING

LabDiet

TestDiet Europe

a:CO

Bienestar animal en el pez cebra. Conceptos generales

Juan Ramos⁽¹⁾ e Ignasi Sahún⁽²⁾

1. Supervisor de la unidad de animales acuáticos del PRBB

2. Co-fundador de la empresa start-up ZeClinics

Buscando a Danio

Probablemente, si sois aficionados a la acuariofilia, conoceréis a los célebres "cebritas", unos pequeños y exóticos peces que suelen nadar nerviosamente cerca de la superficie de los acuarios en los que están confinados. Si no los conocéis, os podéis acercar a cualquier tienda próxima a vuestra casa y, seguramente, los encontraréis en ella. ¿Que cómo los reconoceréis? Buena pregunta. Su característica principal es que su brillante y estilizado cuerpo de escamas plateadas está atravesado horizontalmente por varias bandas de un vistoso pigmento azul, que nos recuerda a las cebras africanas, de ahí su peculiar nombre. Pero en realidad os estamos hablando del pez cebra o del zebrafish o, más correcta y científicamente, del *Danio rerio*.

En este breve artículo, Juan Ramos, veterinario responsable del área de acuáticos del PRBB e Ignasi Sahún, co-fundador de la empresa ZeClinics, trataremos de daros unas cuantas pinceladas sobre los aspectos más relevantes del bienestar animal del *Danio rerio* sin mataros de aburrimiento en el intento. Y trataremos, como objetivo final, que conozcáis un poco mejor algunos aspectos relacionados con el bienestar de este interesantísimo y potente modelo animal.

¿Danio rerio? Venga, ¿y eso qué demonios es?

El *Danio rerio* es un pez tropical de agua dulce de la familia de los ciprinidos y originario del valle del Indikush (Norte de India, Nepal, Sri Lanka) que de adulto alcanza un promedio de 5 centímetros de largo. Le gusta mucho vivir en aguas someras y tranquilas, alejado del cauce central de los ríos, y es capaz de soportar amplias variaciones en sus condiciones ambientales ya que en su hábitat natural tiene que enfrentarse a un terrible clima monzónico (caracterizado por tener una estación muy lluviosa seguida de otra seca). Este clima genera variaciones dramáticas en la cantidad y la calidad del agua de los ríos y, en consecuencia, de los recursos disponibles en ella. Así que nuestro pequeño y exótico pez ha tenido que hacer frente a estos cambios diversificando sus fuentes de alimentación. De esta manera, se alimenta principalmente de invertebrados (acuáticos y terrestres)

aunque también lo puede hacer de detritus y algas. ¡Es un auténtico todoterreno omnívoro!

Aunque ocupa toda la columna de agua, el *Danio rerio* se alimenta principalmente en la superficie. De hecho, si os fijáis en la disposición de su boca, "como si estuviera enfadado", os recordará un poco a un barbo o a una carpa, con quien está emparentado. Eso es porque el pez cebra caza cerca de la superficie, con una velocidad pasmosa, cualquier insecto que se cruce en su camino (su debilidad son los mosquitos).

Por otra parte, el *Danio rerio* es un pez bastante social al que le gusta vivir en cardúmenes (ver Figura 1) o bancos, cuyo tamaño puede variar notablemente. Por ejemplo, en cardúmenes pequeños, de entre 10 y 15 individuos, se suelen establecer jerarquías asociadas a la territorialidad y al control de las zonas de puesta por parte de los machos. Sin embargo, y a pesar de ello, en general no resulta un modelo animal agresivo. De hecho es un pez relativamente tranquilo que vive y deja vivir.

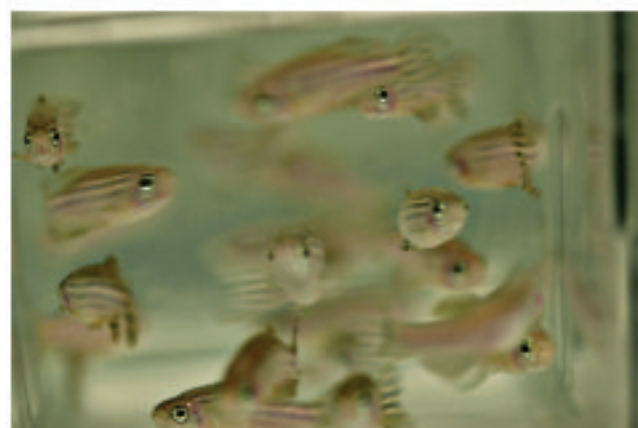


Figura 1.- Cardúmen de *Danio rerio*.

En su hábitat natural el *Danio rerio* se reproduce durante la estación lluviosa, ya que entonces hay disponibles en el medio un mayor número de recursos. De forma muy romántica, la puesta se realiza justo al amanecer, en los márgenes del agua, con cobertura vegetal, prefiriendo los sustratos oscuros y con una granulometría grande. El *Danio rerio* es un pez ovíparo que puede llegar a poner cada 24 horas más de 200 huevos, sin realizar

cuidados parentales, es decir, que se "desentiende" completamente de la puesta e incluso suele devorar sus propias larvas (ver Figura 2). Los huevos son translúcidos, bentónicos (flotabilidad negativa) y de un tamaño relativamente grande (500 micras) para su talla (3-5 cm). Estos peces tienen un desarrollo indirecto, lo que implicará una serie de cambios fisiológicos a lo largo de su vida; el primer reto será pasar de una fase bentónica para adquirir cierta movilidad, gracias al hinchado de su vejiga natatoria. Los machos son más estilizados (a veces con algunas bandas de fondo dorado), mientras que las hembras (con bandas de fondo plateado) son más robustas y con el vientre blanco y redondeado.



Figura 2.- Larvas de *Danio rerio* a pocos días post-fertilización.

Al tratarse de un animal de sangre fría, su desarrollo se verá muy influenciado por las condiciones ambientales. Su esperanza de vida es de entre 3 y 4 años, pero la temperatura del agua, así como el espacio y alimento disponibles, resultarán factores determinantes para su bienestar general; sin duda un reto importante para cualquier instalación y sobre todo, para el personal que la gestione.

El pez cebra en su salsa

Como comentábamos en la introducción, esta especie es (y ha sido durante décadas) una habitual en los acuarios particulares, ya que es capaz de adaptarse a distintas condiciones y convive sin problemas con otras especies en lo que comúnmente se conoce como acuario comunitario. No obstante, para mantenerlo en cautividad (tanto en un domicilio particular como en un laboratorio) hay que prestar especial cuidado principalmente a la calidad del agua desde un punto de vista físico-químico y microbiológico. Os daréis cuenta enseguida que,

salvando las distancias con los ratones, si en éstos tenemos que garantizar la calidad del aire de la instalación, en los peces cebra deberemos disponer de una serie de elementos que nos permitan garantizar el control del agua (ver Figura 3), su acondicionamiento y, por encima de todo, el mantenimiento de sus parámetros óptimos (Sanders, 2012).



Figura 3.- Sistema de impulsión. El proceso de ósmosis genera agua de una alta calidad eliminando los sólidos de la misma.

Afortunadamente, hay una serie de parámetros básicos, o "condimentos de la salsa", que realmente condicionan el bienestar de esta especie. A modo de metáfora de índole vital, tratar de controlar todos los parámetros disponibles no sólo resulta imposible, sino que además es perjudicial, ya que probablemente en nuestro afán de control dejaríamos de prestar atención a lo realmente importante.

- *La temperatura* regula los procesos metabólicos del *Danio rerio* (como en todas las especies poiquilothermas), aunque lo realmente importante es asegurar una estabilidad de la misma, ya que en el medio natural puede vivir en un rango muy amplio de temperaturas (de 16°C a 38°C). Las tablas de desarrollo y condiciones experimentales están estandarizadas en torno a los 28.5°C, por lo que a nivel experimental deberemos ajustarnos a dicha temperatura mediante el uso de calentadores acuáticos.

- *Oxígeno*. Su concentración varía según las propiedades del agua (especialmente salinidad y temperatura) y se encuentra en proporción mucho menor que en el aire. Para oxigenar el agua basta con romper la tensión superficial de manera que el dióxido de carbono procedente de la respiración se difunda al aire y desde el mismo se aporte oxígeno al agua (peces y bacterias).

- *pH*. El pez cebra también tolera con "elegancia" diferentes rangos de pH. Pero al igual que sucede con la temperatura, resulta más importante el gradiente que el valor total del mismo (homeostasis). Cuando hablamos de pH, debemos pensar a continuación en alcalinidad, ya que es ésta la encargada de estabilizar el pH frente a los ataques ácido/básicos. Una forma práctica de controlar este parámetro es mediante el empleo de bicarbonato, dotando al agua de capacidad de tamponamiento. A modo de ejemplo, es lo mismo que lograríamos tomando sal de frutas después de consumir una cena "ligera" a base de morcilla de Burgos, cordero, chorizo picante, queso cremoso y todo regado con dos litros de excelente sidra asturiana.

- *Concentración de sales y/o presión osmótica y/o conductividad*. Los peces deben realizar un gran esfuerzo para mantener su presión osmótica (lo que llamamos estrés hídrico) frente a la del agua. Por este motivo resulta necesario controlar este parámetro para no agravar esta diferencia. Así, por ejemplo, un ligero aumento de la concentración de sales irá en decremento de la eficacia reproductiva (al asociarlo el pez a la época de sequía) pero reducirá su estrés hídrico. La ajustaremos mediante el empleo de un conductímetro y la adición de sal al agua del sistema.

- *Compuestos nitrogenados*. Como producto del catabolismo los peces excretan amoníaco, que es altamente irritante y corrosivo (como podemos comprobar al usarlo domésticamente para desincrustar aquellas "tremendas y misteriosas" manchas de los inodoros). Pues bien, resulta fascinante observar que la naturaleza cuenta con un verdadero sistema de reciclaje, que en este caso estará representado por las ubicuas bacterias nitrosomonas y nitrobacter (que son aerobias y consumen una gran cantidad de oxígeno del agua) y un último proceso de nitrificación anaerobia. Por lo tanto, al final del proceso aerobio tendremos el nitrato como producto final de dicho ciclo (parte de él para ser más estrictos). Este proceso que os comentamos, por el que el amoníaco se convertirá en nitrito y nitrato, representa una importante disminución de la toxicidad del agua y se llevará a término en el biofiltro, un dispositivo capaz de eliminar los compuestos nitrogenados.

- *Cloro*. Está presente en el agua para purificarla y desinfectarla, pero si para nosotros en forma de gas puede resultar letal (sólo tenéis que escribir literalmente "la he liao parda" en Google y disfrutar del video), en el agua también es un terrible enemigo para los peces, ya que oxida sus branquias en su forma libre (disuelto), mientras que en su forma combinada (asociado a materia orgánica) todavía se desconoce su efecto.

Afortunadamente, el carbón activo es una potente y eficaz barrera frente al cloro, adsorbiéndolo, y por ende, desactivándolo. ¿Quién no ha probado alguna vez agua de una jarra Britta?

A la hora de diseñar un sistema de recirculación de agua se tienen en cuenta todos estos parámetros y se le dota de los mecanismos para mantenerlos. También hay que considerar que el propio tanque donde se van a mantener los peces debe posibilitar un correcto desarrollo, así como permitir la natación de manera normalizada. Al ser peces pelágicos no es necesario dotar los tanques de ningún sustrato, lo que facilita enormemente su limpieza.

Doctor, mi pez cebra está enfermo

En general, los peces confinados en las instalaciones de carácter científico presentan una gran cantidad de patologías que no tienen directamente un origen infeccioso, y que en su mayoría están relacionadas directamente con la calidad de alguno o varios parámetros del agua que ya hemos comentado.

Por ejemplo, una temperatura inadecuada puede causar inmunosupresión; la depleción de oxígeno por un estancamiento del agua provocará hipoxia; una intoxicación por amoníaco producirá excitabilidad, anorexia, hipertrofia branquial o hipoxia; un exceso de nitritos produce hipoxia debida a la conversión de la hemoglobina en metahemoglobina; un desajuste del pH dará lugar a acidosis o alcalosis y, finalmente, una salinidad inadecuada generará estrés hídrico y un desequilibrio en la osmoregulación. Ya os podéis hacer una idea de lo importante que resulta mantener ese equilibrio. Una patología clásica es también la "enfermedad de la burbuja", que consiste en la súper-saturación de aire del agua causada normalmente por la aspiración de aire a presión (cavitación), que genera trombos en los peces (veremos la superficie del agua como la veríamos a través de un vaso lleno de un refresco carbonatado abierto durante un par de horas: con un ligero burbujeo), con lo que apreciaremos burbujas debajo de las aletas y de los ojos de los peces. Por otra parte, debido a una dieta desequilibrada y a un pobre control del agua, o más concretamente, debido a elevados niveles de nitritos, algunos peces cebra pueden sufrir hidropesía, una enfermedad crónica caracterizada por una visible hinchazón del abdomen debido a la retención de líquidos en los tejidos.

Hay que tener en cuenta que el agua a nivel sanitario ejerce de barrera y vector a la misma vez, ya que muy pocos organismos son capaces de colonizar el agua a través del aire (sólo algunos hongos), pero una vez que llegan a él se diseminan a gran velocidad. Por ello habrá que ser muy estricto con lo que se

introduce en el agua (ver Figura 4), con la desinfección de material, manos, alimentos... Aun así en el agua nos podemos encontrar gran variedad de bacterias que pueden ser patógenas pero que normalmente lo son de una manera secundaria (oportunistas) y son capaces de colonizar a los animales ya sea por una herida o por un estado de inmunodepresión de los peces causada por estrés (Pavlidis et al., 2013). De todas formas, la simple instalación de unas lámparas germicidas hará disminuir la carga microbiológica del agua, mejorando su calidad sanitaria.



Figura 4.- La introducción de cualquier material en el agua deberá estar siempre estrictamente regulada.

Aun así, los peces son susceptibles de sufrir diversos tipos de enfermedades infecciosas (Maley et al., 2013). Sin ir más lejos, muy recientemente, una publicación acuñada en nuestro país proponía de forma magistral al pez cebra como modelo para estudiar los mecanismos de actuación de infecciones virales como el ébola o el dengue (Varela et al., 2014), abriendo una puerta inmensa a su uso en la más moderna investigación en virología¹.

Aunque no se ha conseguido llegar a una estandarización sanitaria de los peces cebra, sí que se están empezando a obtener ciertos stocks de animales "SPF" a semejanza de los roedores. Ciertos patógenos como la microfilariasis (lombrices parasitarias) han sido prácticamente erradicados de las instalaciones de cebritas, mientras se sigue manteniendo una dura batalla frente a otros como puede ser la *Pseudomonas* o frente al *Mycobacterium* (Takaki et al., 2013). El desarrollo de herramientas tecnológicas (detección de PCR's) ha permitido el control sanitario de una manera más veraz, y erradicar poblaciones infectadas con estos patógenos de curso crónico y muchas veces de portadores asintomáticos. De hecho, con frecuencia es el propio sistema (la acumulación del biofilm en las conducciones) el que puede actuar como reservorio.

Y no sólo estos patógenos son los que atacan al pez cebra si no que existen muchísimos más. Como hemos comentado con

anterioridad, muchos de ellos sólo afloran cuando hay otro problema primario que permite el desarrollo del patógeno (heridas, inmunodepresión, desequilibrios nutricionales, estrés crónico, etc.). Cuando esto ocurre debemos "apartar los árboles para poder ver el bosque" y no quedarnos sólo con el patógeno, actuando de esta manera sobre el origen del problema. Eso requiere de una visión de las instalaciones tomándolo como un todo: agua, condiciones ambientales, peces, alimentación, patógenos... al igual que en el hábitat natural.

Generalmente, a parte de la extracción mecánica de la materia orgánica mediante el sifonado (aspiración) de los detritos y la filtración del agua para la retención de las partículas, habrá que reducir la carga de microorganismos mediante métodos de desinfección como son las lámparas ultravioletas.

Cerrando la tapa del acuario

Como habréis podido observar, el pez cebra es algo más que un elemento decorativo de algunos fanáticos de la acuariofilia.

Inicialmente, trabajar con un modelo acuático puede parecernos realmente complicado, y no es extraño. Por un lado, conceptualmente, el entorno de trabajo del *Danio rerio* resulta radicalmente diferente a lo que estamos acostumbrados a observar en una instalación. Por otro, no deja de ser un pez, y psicológicamente nos es difícil acercarlo filogenéticamente a nosotros, pero cuando profundizamos un poco en el modelo nos resulta extremadamente sencillo entender el motivo por el que actualmente se considera al *Danio rerio* una auténtica revolución científica en el campo de los modelos animales de investigación. Y es que en la última década se ha ido afianzando paulatinamente en el campo de la investigación biomédica debido a varios aspectos fundamentales, que le otorgan una potencia enorme en el modelaje de enfermedades y en su ulterior estudio. Por ejemplo, su fácil manejo, su extraordinaria capacidad reproductiva, su bajo coste de mantenimiento, su susceptibilidad a ser manipulado genéticamente, su homología genética con los humanos y su transparencia óptica en fases embrionarias y larvales.

Resulta sencillo encontrar un gran número de revisiones recientes sobre el uso del pez cebra en biomedicina que abarcan aspectos tan distantes como la neurociencia, la inmunología, la oncología, la endocrinología y un largo etcétera de disciplinas que se alimentan de resultados obtenidos con este poderoso modelo animal.

¹Nota del Editor: ver Actualidad en este mismo número.

No obstante, aún tiene mucho camino que recorrer. Una prueba fehaciente de ello es que en Pubmed hay indexadas 22.373 entradas bajo la palabra clave "zebrafish" y, sin embargo, aparecen 1.268.207 para la palabra "mice". Así que, tanto si lo vemos como un modelo complementario, como si lo vemos como un modelo sustitutorio de otros modelos animales ya existentes, al *Danio rerio* todavía le queda un largo camino por recorrer. Pero la carrera no ha hecho más que empezar.

BREVE BIBLIOGRAFÍA

- Varela M., Romero A., Dios S., et al. Cellular Visualization of Macrophage Pyroptosis and IL1 β Release in a Viral Hemorrhagic Infection in Zebrafish Larvae. *J Virol* 2014. doi: 10.1128/JVI.02056-14
- Pavlidis M., Digka N., Theodoridi A., et al. Husbandry of zebrafish, *Danio rerio*, and the cortisol stress response. *Zebrafish* 2013, 10(4): 524-31.
- Maley D., Laird A.S., Rinkwitz S., et al. A simple and efficient protocol for the treatment of zebrafish colonies infected with parasitic nematodes. *Zebrafish* 2013, 10(3): 447-50.
- Takaki K., Davis J.M., Winglee K., et al. Evaluation of the pathogenesis and treatment of *Mycobacterium marinum* infection in zebrafish. *Nat Protoc*. 2013, 8(6): 1114-24.
- Sanders G.E. Zebrafish housing, husbandry, health, and care: IACUC considerations. *ILAR J*. 2012, 53(2): 205-7.



Foto: shutterstock

**TÚ TAMBIÉN
PUEDES SER
PARTE DE
LA SECAL**
¡HAZTE SOCIO!

www.secal.es



Lechos Premium para
Animales de Laboratorio



LIGNOCEL®

Eficacia, fiabilidad y
trazabilidad aseguradas.



Calidad superior certificada acorde
ISO, HACCP, PEFC y EnMS

Travesera de Gracia 56, 2º2
08006 Barcelona
Tel. 933 262 888
e-mail: info@jrsliberica.com

RETENMAIER IBÉRICA
S.L. Y CIA. S. COM.



Fibras diseñadas
por la naturaleza

Una compañía del grupo IRS

La severidad en los procedimientos: Algunas consideraciones para su evaluación

José M. Orellana-Muriana

*AWSHEL-IAS Grupo de Bienestar Animal:
Ciencia, Humanidades, Ética y Leyes, especializada en estudios
interdisciplinarios de animales de la Universidad de Alcalá
y el Instituto Franklin.
Coordinador del Grupo de Trabajo de FELASA/ESLAV/ECLAM
para la evaluación retrospectiva en los procedimientos.*

PREÁMBULO

La severidad puede definirse como el grado de afectación que sufre un animal en su bienestar y/o salud debido a la realización de un procedimiento o experimento, pero no solamente en el transcurso del mismo, sino durante el resto de su vida.

Por razones éticas y legales, debemos estimar la severidad que se va a producir antes de iniciar el experimento. Esta estimación debe hacerse por dos razones principales. En primer lugar, para que los efectos negativos inherentes sobre el animal puedan minimizarse mediante el establecimiento del refinamiento y del criterio de punto final. En segundo lugar, la severidad de todos los procedimientos en un experimento contribuye al sufrimiento acumulado que el animal experimentará el resto de su vida.

El Grupo de Trabajo formado por representantes de FELASA (Federación Europea de Asociaciones para las Ciencias del Animal de Laboratorio), ESLAV (Sociedad Europea de Veterinarios de Animales de Laboratorio), y ECLAM (Colegio Europeo de Especialistas en Medicina del Animal de Laboratorio), como agentes sociales en la Unión Europea, ha elaborado una serie de recomendaciones para la evaluación prospectiva y retrospectiva de la severidad en los procedimientos con animales, a publicar en la revista científica *Laboratory Animals*, algunos de cuyos ejemplos propuestos están disponibles en la web de la Unión Europea http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/examples.pdf.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la investigación con animales implica el establecimiento de una relación entre el investigador y el animal. Dado que el animal de experimentación es la parte más débil en esta relación, los científicos de hoy en día tienen la obligación

legal y moral de proteger a los animales y asegurar que su bienestar se vea comprometido lo menos posible.

Partiendo del hecho que un experimento puede afectar el bienestar del animal, debemos tener siempre en cuenta los siguientes puntos al realizar la investigación:

1. La severidad de cualquier procedimiento/experimento, debe ser evaluada durante el transcurso del mismo y después de su finalización.
2. La severidad de cualquier procedimiento/experimento puede reducirse y minimizarse mediante el establecimiento del criterio de punto final para el mismo.
3. Todos los procedimientos y experimentos pueden contribuir a un sufrimiento acumulado que el animal experimentará durante el resto de su vida.
4. Los investigadores deben estar familiarizados con el concepto de refinamiento con el fin de minimizar el dolor real o potencial, la angustia, y otros efectos adversos sobre el animal en un procedimiento/ experimento.

Estos cuatro puntos son especialmente relevantes en aquellos experimentos que potencialmente puedan tener un impacto inusualmente alto sobre el bienestar del animal, tales como una investigación sobre cáncer o en estudios de neurociencias.

CUÁNDO EVALUAR LA SEVERIDAD

Antes de comenzar cualquier experimento, debe evaluarse la severidad potencial de todos los procedimientos incluidos en el mismo con el fin de evitar un innecesario sufrimiento a los animales. En bastantes casos, también tendrá que reevaluarse la severidad al final del experimento con el fin de determinar el verdadero sufrimiento, malestar, angustia y sufrimiento acumulados por el animal y debido a los propios procedimientos y experimentos.

Esta segunda evaluación, llamada evaluación retrospectiva, permitirá a los investigadores ajustar, en futuras investigaciones, los procedimientos con el fin de preservar el bienestar del animal y, del mismo modo, ayudará a los investigadores noveles a apoyarse en esa experiencia. Esta evaluación retrospectiva también podrá permitir a los investigadores considerar la

posibilidad de reutilizar los animales en otro experimento, darlos en adopción o realojarlos, cuando el nivel de severidad sea bajo y el animal se haya recuperado totalmente.

Debe asignarse una categoría de severidad en función del nivel esperado o real de sufrimiento que experimente el animal durante, o después de un procedimiento. Aunque el número y el nombre de estas categorías (niveles) varían de país en país, la severidad se califica generalmente en términos de "leve", "moderado", y "severo".

Estas evaluaciones pueden hacerse con la ayuda de hojas de puntuación (*score sheets*) donde estimaremos los signos clínicos aparecidos o las desviaciones de la "normalidad", mediante la asignación de un valor en puntos, cada vez más alto a medida que el grado de severidad aumente. Normalmente, se utiliza el criterio de puntuación de 0 a 4, siendo 0 lo normal y 4 la severidad máxima.

Este tipo de hojas sirven a su vez para justificar ante la Autoridad Competente y el Comité de Ética de nuestra institución, la realización de un correcto seguimiento y evaluación del bienestar de los animales durante el experimento.

FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN EL NIVEL DE SEVERIDAD DE UN PROCEDIMIENTO

Teniendo en cuenta que los dos principales factores que influyen en la severidad son la duración del experimento y la intensidad del mismo, hay otros muchos factores que también pueden influir en el nivel de dolor, sufrimiento y angustia que un animal puede experimentar durante o después de un procedimiento. Estos factores pueden clasificarse según estén relacionados con el procedimiento, los animales, el mantenimiento de los mismos, el personal y aquellos otros factores que pueden hacer que la severidad disminuya. Veamos algunos de ellos:

Factores relacionados con el procedimiento

- El tipo y número de tratamientos y el método de aplicación o administración al animal.
- Las características físicas y químicas de la solución que se va a administrar al animal, tales como su pH, consistencia, densidad o concentración.
- La intensidad, duración y frecuencia del procedimiento, y el intervalo entre procedimientos sucesivos.

Factores relacionados con el manejo y mantenimiento de los animales

- El método de alojamiento de los animales durante el experimento, tal y como la individualización durante estudios metabólicos, o el aislamiento en un estudio de micro-organismos infecciosos.
- Los métodos para inmovilizar al animal, tales como el uso de dispositivos de retención o la anestesia.

Factores relacionados con los animales

- La especie animal, su tamaño, edad y sexo. Por ejemplo, el tamaño y la edad del animal pueden determinar el volumen y la frecuencia de la toma de muestras sanguíneas en dicho animal, siempre y cuando el volumen no exceda el 10% del volumen de sangre total. Es lógico pensar que es más fácil hacer un muestreo repetido de sangre en una vaca que en un ratón, al igual que será menor el impacto fisiológico de la muestra sanguínea en la vaca que en el ratón.
- El genotipo del animal. Hay que tener en cuenta que una modificación genética inducida puede tener su propio nivel inherente de severidad, y puede afectar al bienestar y/o la salud de un animal genéticamente modificado en cualquier momento de su vida.

Factores relacionados con el personal

Dado que la destreza para el manejo de animales por parte de los investigadores, cuidadores y técnicos puede influir en la severidad de los procedimientos, la persona encargada de llevar a cabo los mismos debe ser consciente de que todas las especies de animales vertebrados sienten y padecen. Del mismo modo, esa persona debe tratar a cada animal de modo individual y no como parte de un grupo.

Esta persona debería tener un conocimiento adecuado de lo siguiente:

- Bienestar de los animales.
- La "normalidad". El investigador debe estar familiarizado con lo que es "normal" en la especie animal que utilice, y debe saber qué especie es la más adecuada para un experimento determinado. Por otro lado, lo "normal" no es siempre lo "óptimo". Por ejemplo, los machos de algunas cepas de ratón son inherentemente más agresivos que otros y su comportamiento hacia sus compañeros puede producirles lesiones. Aunque este comportamiento agresivo sea

"normal", no debe considerarse beneficioso para el bienestar del animal y debe remediarse.

- Los potenciales efectos negativos de cada procedimiento sobre el bienestar del animal.

Factores que disminuyen la severidad

La severidad de un procedimiento o experimento puede ser disminuido mediante:

- Un personal experto que forme a la persona que va a llevar a cabo el procedimiento para que no cause molestia, dolor o sufrimiento innecesario a los animales.
- Acostumbrar/entrenar al animal antes de que se lleve a cabo el procedimiento a fin de que coopere en el mismo.
- La aplicación de métodos de refinamiento con el fin de minimizar el malestar, dolor y sufrimiento del animal.
- La aplicación temprana del criterio de punto final para evitar causar un malestar, dolor y sufrimiento extremos e innecesarios al animal.

REFINAMIENTO

El refinamiento es cualquier método que evite o minimice el dolor real o potencial, la angustia y otros efectos adversos que un animal experimenta durante su vida, o que mejore su bienestar físico y psicológico. El propósito del refinamiento en la investigación con animales es maximizar los beneficios de la investigación y como decía T. Poole: "los animales felices hacen una buena ciencia". Hoy en día, es éticamente obligatorio que un investigador aplique todos los métodos disponibles de refinamiento con el fin de minimizar al máximo, el nivel de severidad de un procedimiento o experimento. Ya conocemos la anestesia, analgesia y otros más frecuentes, pero también tenemos otros:

1. El enriquecimiento ambiental.
2. Modificar el diseño de los experimentos con animales utilizando aplicaciones informáticas de bioestadística con el fin de reducir el número de animales que serán utilizados en un experimento.
3. Mejorar la realización de un procedimiento específico o de una intervención, como puede ser el perfeccionamiento de un método quirúrgico.
4. La formación del personal para la realización de un determinado procedimiento.
5. La aplicación del criterio de punto final.

CÓMO ASIGNAR UN NIVEL DE SEVERIDAD

El nivel de severidad de un procedimiento o experimento puede ser determinado por la valoración del nivel de malestar que un individuo experimenta durante un procedimiento o experimento. Esta valoración debe hacerse individuo por individuo, no sobre un grupo de animales y siempre después de que se hayan aplicado todas las técnicas de refinamiento para disminuir dicha severidad.

Como ya se ha comentado, debe asignarse una categoría de severidad en función del nivel esperado o real de sufrimiento que experimente, o vaya a experimentar, el animal durante o después de un procedimiento. La severidad de cada procedimiento debe evaluarse por separado en un experimento y será el procedimiento con una severidad más alta el que determine el nivel de severidad de todo el experimento.

Con ello, en el futuro, podrá determinarse anticipadamente el nivel máximo de severidad para procedimientos o experimentos concretos, mediante la revisión de las puntuaciones que se obtuvieron en experimentos precedentes.

LÍMITE MÁXIMO DE SEVERIDAD

El límite máximo de severidad permitido es aquel valor numérico por encima del cual no se permite la realización de un procedimiento, e indica el momento en que debe aplicarse el punto final y tomar medidas (acciones), tales como detener el proyecto o sacrificar al animal.

El límite máximo de severidad permitido para un procedimiento o experimento debe establecerse antes del inicio del procedimiento o experimento. La determinación de este límite máximo debe hacerse utilizando indicadores de salud y bienestar animal, teniendo en cuenta también las condiciones en las que el procedimiento se va a realizar. Por ejemplo, el límite máximo de severidad puede ser determinado por la aparición y/o desaparición de signos clínicos, o bien cuando se reducen las medidas de bienestar de los animales durante un procedimiento o un experimento.

CRITERIO DE PUNTO FINAL HUMANITARIO

A pesar de que durante la investigación haya momentos en que sea inevitable producir dolor, angustia o sufrimiento al animal, en términos de la afectación del bienestar y salud animal "todo lo evitable hay que evitarlo".

El punto final humanitario ya ha sido definido de diferentes maneras por diferentes organizaciones y personas pero a efectos de este artículo, el punto final se define como:

- El indicador más temprano durante un experimento en el que un animal está experimentando un dolor, angustia o sufrimiento extremos o que la muerte es inminente, y debe reflejar el deterioro real o inmediato de la condición física y psicológica de un animal.
- El momento en el que el experimento debe detenerse porque el estado físico y/o psicológico del animal hace que sea difícil y, a veces, imposible continuar o completar el procedimiento o experimento.
- El momento en el que el dolor, la angustia o el sufrimiento del animal exceden el límite máximo de severidad permitido y debe considerarse la eutanasia.

Con todo ello, los objetivos para establecer el criterio de punto final de un experimento son: (a) reducir al mínimo el efecto de la investigación sobre el bienestar, al reducir o eliminar el sufrimiento evitable del animal, y (b) predecir el momento en el que aparecerá el dolor, angustia y sufrimiento extremos y la muerte inminente, antes de que el animal llegue a esta situación.

Por otro lado, desde el punto de vista de la calidad de la investigación, la recopilación de los datos (resultados) del experimento, cuando el animal está padeciendo un dolor o sufrimiento extremo, puede comprometer la calidad de los mismos y distorsionar los resultados. El punto final humanitario debe establecerse antes de que el animal se encuentre mórbido, por lo que la muerte del animal no debería utilizarse nunca como criterio de punto final.

Por ejemplo, podría considerarse como punto final temprano en un animal con un tumor cerebral el inicio de una paresia, o una parálisis en la extremidad trasera. En ese caso no sería necesario mantenerlo con vida porque permitirle vivir podría (a) comprometer gravemente el bienestar del animal al causarle un sufrimiento innecesario, y (b) aumentar el riesgo de desarrollar complicaciones no deseadas, tales como la aparición de infecciones.

HOJAS DE VALORACIÓN (Score Sheets)

Ya que sabemos que (a) la evaluación de la severidad de un procedimiento o experimento es subjetiva, y (b) que hay una falta de herramientas que nos permitan determinar los sentimientos reales de los animales, continuamente se están desarrollando sistemas y hojas de valoración, que puntúan los signos clínicos e

intentan medir el bienestar de los animales lo más objetivamente posible.

Una hoja de puntuación es una tabla en la que un individuo debe puntuar un signo clínico aparecido en un animal durante el curso de un experimento, de acuerdo con el cambio que se haya producido desde lo normal (alejamiento de lo normal).

Las hojas de puntuación también puede ser una herramienta muy útil para evaluar la severidad de un procedimiento o un experimento y se pueden utilizar durante y después de cada procedimiento, para el seguimiento de un individuo y para hacer la evaluación retrospectiva de la severidad.

Estas hojas también son útiles para evaluar la intensidad de los procedimientos y la determinación del sufrimiento acumulado. Cuando se utiliza una hoja de este tipo, lo más crucial es que el investigador esté familiarizado con lo que es "normal" para esa especie con respecto al procedimiento que se trate.

Se hace imprescindible la colaboración del investigador principal, el veterinario, el encargado del bienestar animal, de un técnico experto o del cuidador de animales para que un observador todavía novel e inexperto aprenda a anotar los signos y comportamientos clínicos del animal.

Las hojas pueden y deben adaptarse a cualquier tipo de experimento. Así, se recomienda que estén en formato electrónico para poder modificar la hoja en cualquier momento y permitir el registro de hallazgos inesperados y de nuevos eventos durante el procedimiento o experimento. También se recomienda que una hoja de puntuación se estructure de tal manera que los resultados de las diferentes formas de observación, por ejemplo a distancia o durante el manejo de los animales, puedan ser fácilmente anotados.

Algunos de los elementos que deberían incluirse en la hoja son:

1. Todos los datos relevantes sobre el animal, investigador y título del proyecto.
2. Detalles de todos los procedimientos o técnicas que se realizarán en el animal.
3. Detalles del día y/u hora del día en que se realiza cada procedimiento.
4. El número de veces que cada procedimiento se hará en el mismo animal.
5. Detalles de los signos clínicos que son de esperar, de acuerdo con la experiencia previa, o porque hayan sido publicados en la literatura científica.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, a continuación se muestra un ejemplo de parte de una hoja de valoración en un experimento concreto.

Ejemplo de una hoja de valoración de la severidad y bienestar animal en un experimento de evaluación de un nuevo agente anticancerígeno, en un modelo de ratón tumoral primario (hude)

Observación General			
Observación general	Sistema de valoración	Puntuación	Señal
Peso (pérdida de peso)	Pérdida de peso entre 0 - 1%	0	
	Pérdida de peso entre 5 - 10%	1	
	Pérdida de peso entre 10-15%	2	
	Pérdida de peso entre 16%-20%	3	
	Pérdida de peso superior al 20%	4	
Observación y Síntoma			
Parámetros Físicos (aparencia)	Sistema de valoración	Puntuación	
Reflexo (almeo)	Indicador: reacción al estímulo de la respiración	1	
	Normal	0	
	Falta general de tono	1	
	Demencia anular por nasal	2	
Desorientación	La piel no responde del todo al estímulo o forma atípica	1	
	Desorientación más leve	4	
Postura anormal	Distorsión del movimiento	1	
	Extremadamente	2	
Locomoción	Tardecera que interfiere en la locomoción	4	
	Indicador a parálisis de los miembros	4	
Parámetros Ambientales	Sistema de valoración	Puntuación	
Aspecto de la heces	No heces o heces blandas	1	
	Blancas	2	
	Verdes	3	
	Sangre en heces	3	
	Verdes de heces	4	
Alimentación y bebida	Aparición de náuseas después de la ingesta	1	
	Aparición de náuseas	2	
	No beber	3	
Parámetros Psicológicos	Sistema de valoración	Puntuación	
Respuestas	Normal	0	
	Afectado (disociado)	1	
	Letargo (inerte)	2	
	Tristeza (no interactúa)	3	
	Suspensa o estresada (destruye cosas y/o ruidos)	4	
Parámetros Psicológicos	Sistema de valoración	Puntuación	
Comportamiento	Normal	0	
	Letargo (inerte) después de la ingesta	1	
	Cambios marcados en el comportamiento / a aislamiento de sus compañeros de jaula	2	
	Reacciones violentas / reactivas	3	
	Interrupción de actividades rutinarias	4	
Modificación de la conducta	Abstracción	1	
	No respuesta a estímulos	2	
Observación durante el tiempo			
Parámetros Físicos	Sistema de valoración	Puntuación	
Condición corporal	Cuajada	4	
	No Anemia	0	
	Discreción (Abdomen)	2	
	20% aumento del perímetro del abdomen, similar a una prueba positiva	4	
Parámetros Psicológicos	Sistema de valoración	Puntuación	
Tolerancia	Normal	0	
	Fuerte	1	
	Agotada	2	
	Hipersensibilidad	3	
Reflexo	La pinza (punta pinza)	4	
	Cambios (punta pinza)	4	
Indicadores específicos del procedimiento			
Parámetros Físicos	Sistema de valoración	Puntuación	
Crecimiento tumoral (diámetro)	0.3cm- la línea, no tratado	1	
	0.5cm- 1.1cm, no tratado	2	
	0.3cm- la línea, tratado	3	
	0.5cm- 1.1cm, tratado	4	
	> 1.1cm, no tratado	4	
	> 1.1cm, tratado	4	
Ultrasonido del tumor	Resolución	2	
	Resolución supuesta	3	
	Resolución real	3	
	Resolución supuesta (48 horas)	4	
	Ultrasonido (48h)	4	
	Infirmitad de garras	4	
Suma total severidad diaria acumulada			1
HUMAN (observación)			1

Finalmente, la hoja deberá incluir siempre las instrucciones de lo que se debe hacer al animal según el nivel de severidad alcanzado, tal y como aparece en el ejemplo siguiente (Nota: La puntuación que aparece en la tabla de debajo solo sirve a modo de ejemplo, en la realidad cada uno debe establecer su propia puntuación).

Instrucciones para las acciones a tomar en el animal según el nivel de severidad		
Puntuación total de la severidad	Acciones a tomar dependiendo del nivel de severidad	Nivel de severidad
0	Normal	Leve
1-5	Mayor observación	Leve
6-8	Aumento de la frecuencia de observación. Considerar medidas correctoras que mejoren el bienestar (suplementar fluidos y cuidados y medidas para aliviar el sufrimiento). Avisar al investigador.	Moderado
9-11	Probabilidad de sufrimiento significativo. Aplicar medidas para aliviarlo, observar frecuentemente, considerar eutanasia como punto final.	Severo
> 11	Máximo nivel de severidad. Sufrimiento severo. Inmediatamente se recomienda repetir este experimento. Si hubiera que hacerlo deberá justificarse plenamente la razón a la autoridad competente.	Límite máximo de severidad

APLICACIÓN DEL LÍMITE MÁXIMO DE SEVERIDAD PERMITIDO EN LAS HOJAS DE VALORACIÓN.

El nivel máximo de severidad de un experimento puede averiguarse observando en qué momento se produjo la suma más alta de todas las puntuaciones de todos los signos clínicos de ese experimento. Por ejemplo, si en un experimento se fijó previamente en 12 el límite de severidad máximo permitido, este resultado significa que el procedimiento o experimento deberá ser detenido (punto final) cuando la severidad del experimento llegue a 12. Si ese experimento debiera repetirse en otra investigación futura, tendría que estar plenamente justificado ya que tiene el potencial riesgo de poner en peligro el bienestar del animal.

Por otro lado, cuando de forma independiente un solo signo clínico alcance en la hoja su máxima puntuación en una escala de 0 a 4, en donde "0" es lo normal y "4" es la máxima severidad, deberá aplicarse el punto final de inmediato, incluso si las puntuaciones de la severidad del resto de signos clínicos son inferiores a 4.

NOTA: El artículo contiene la traducción al español de algunos fragmentos del capítulo de José M^o Orellana Muriana "Animal Models in Cancer Research: Assessment of Severity and the Application of Humane Endpoints". *NeuroMethods* (2012) DOI 10.1007/7657_2012_59. © Springer Science+Business Media New York 2012. La versión original completa puede obtenerse en:

http://link.springer.com/protocol/10.1007/7657_2012_59#

International Product Supplies Limited



Feeding the Innovations of Modern Research

- European Manufacture
- Used & Trusted in Facilities Worldwide
- Fast Flexible Lead Times
- Nutritional Expertise & Advice
- Traceability
- Quality Assurance
- Prompt Delivery
- Modern Technology

TestDiet Europe

- DIO High Fat Range
- Fenbendazole
- Doxycycline
- Helicobacter
- AIN Series
- Tamoxifen

www.testdiet.com



LabDiet

- All Species
- Meal
- Autoclavable
- Irradiated
- Extruded
- GLP

www.labdiet.com



Also available to order
in Spain and Portugal
from IPS distributor:

Sodispan Research S.L.

C/ Isla de Tavira, 14
28035 Madrid, Spain

Phone: +34 629159613

Facsimile: +34 914593962

Email: sodispan@sodispan.com

Cuando la trazabilidad es una necesidad **SOURALIT** es su garantía

SOURALIT

Madera no resinosa

Mínima presencia de polvo

Gran capacidad de absorción

Presentaciones irradiadas envasadas al vacío

Análisis microbiológicos y físico-químicos de los lotes entregados



Mucho ratón y mucha gente: codificación, marcado y genotipado de ratones en un animalario de barrera

M.J. Molina-Cimadevila y A. Caler

Instituto de Neurociencias de Alicante (UMH-CSIC)

Introducción

La identificación y toma de muestras para genotipado es una técnica básica, imprescindible en el marcado de ratones alterados genéticamente. Además, es frecuente especialmente en instalaciones grandes y/o de barrera, que la persona que hace las marcas no sea la misma que las lee, con lo que se hace vital tener un sistema inequívoco de identificación y codificación de los animales, para evitar confusiones. El sistema además debería ser ágil de realizar y respetuoso con el bienestar animal, e idealmente permitir la obtención de tejido para genotipado en el mismo acto [1].

Recientemente, se publicó en esta misma revista una interesante revisión de técnicas de identificación y marcado utilizadas en distintos animalarios [2].

En el presente artículo, revisamos el sistema de codificación y marcado utilizado en los animales transgénicos del Animalario de Ratones Modificados Genéticamente del Servicio de Experimentación Animal, en el Instituto de Neurociencias de Alicante (Universidad Miguel Hernández-CSIC) desde su apertura en 2008. Se trata de un animalario de barrera, donde el manejo de las colonias de transgénicos lo realiza exclusivamente el personal del animalario, bajo las instrucciones de los laboratorios. Asimismo, desarrollamos el protocolo utilizado para el genotipado con muestras obtenidas mediante perforación auricular.

IDENTIFICACIÓN Y MARCADO

Procedimiento

En nuestro animalario cada ratón tiene un código único asignado, desarrollado por nuestro grupo, con la siguiente estructura:

XXN-R-AAA-BB

XXN corresponde al código interno dado por el animalario de la línea transgénica, siendo XX las iniciales del investigador principal y N un número correlativo de las líneas asignadas a ese investigador.

La R hace referencia a la especie, en este caso el ratón.

AAA corresponde al número correlativo de cada animal de esa línea. El programa informático lo asigna al alta y en el animal se marcan las dos últimas cifras de ese código.

BB corresponde al año de nacimiento.

Así por ejemplo, el ratón AB1-R-57-14, es el 57º ratón nacido en 2014 de la línea codificada como AB1 y el número que tiene marcado en la oreja es el 57.

Cuando se trata de líneas procedentes del cruce de otras (por ejemplo, del sistema Cre-lox), el código de línea tiene esta forma: XXNxYYN-R-AAA-BB. De este modo, el animal AB1XAB7-R-32-14 sería el 32º animal nacido en 2014 de la línea AB1XAB7.

A las 3 semanas de vida, los animales se destetan y se marcan por perforación auricular, según el código reflejado en la Figura 1. Para ello utilizamos unos marcadores de orejas comerciales (Fine Science Tools, Nº referencia: 24214-02 o 24210-02).

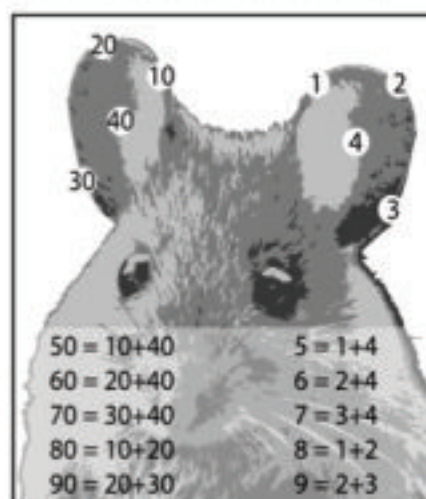


Figura 1.- Esquema de perforación auricular.

El número que tendrán los animales corresponderá a las 2 últimas cifras del número AAA (ver Figura 2). Por tanto, el ratón 14 y el 114 tendrán la misma numeración en la oreja. Es teóricamente posible que estén en una misma jaula, pero esto en la práctica no suele suceder. Si se diera el caso se utilizaría algún sistema adicional de identificación como el tatuaje de dedos.

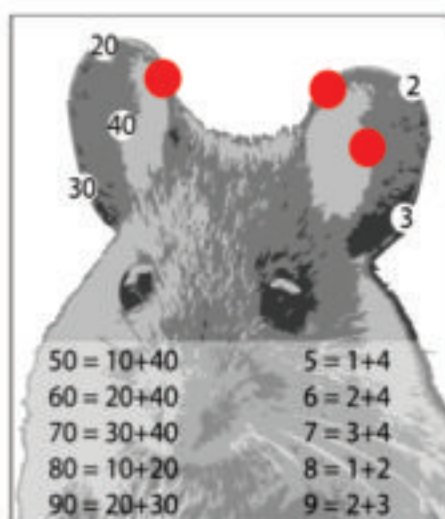


Figura 2.- Marcas que corresponderían al ratón HC3-R-15-14.

Cuando es necesario para el genotipado, se recogen en tubos Eppendorf® las muestras de tejido que resultan de la perforación de la oreja (Ver Figuras 3, 4 y 5). Cuando estas muestras implican sólo el número 4 (el 4, el 40, el 44...), el fragmento de oreja no suele desprenderse, con lo que se recurre al corte de la punta de la cola. El técnico avisa por medio de correo electrónico al responsable de la línea o al técnico de genotipado, para que recoja las muestras del animalario.



Figura 3.- Los tubos se rotulan con el código del animal.

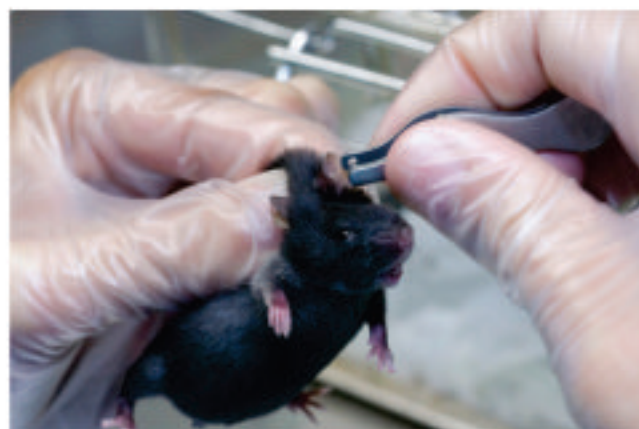


Figura 4.- Se realiza la toma de muestras.



Figura 5.- Se recoge el fragmento de tejido para genotipado.

Este sistema se ve acompañado de un sistema de etiquetado de las jaulas basado en colores. Cada línea de ratones tiene asignado un color de etiqueta, de manera que resulta fácil e intuitiva la localización de las líneas. En las etiquetas se anotan a mano los animales que están en ese momento en cada jaula, por lo que la localización en la sala de un animal resulta rápida (ver Figura 6).

Los investigadores, a través de la plataforma informática, solicitan servicios (cruces, sacrificios, entregas, tapones...) al animalario haciendo referencia a los animales codificados de esta forma (ver Figura 7).



Figura 6.- Cada línea tiene asignado un color de etiquetas, lo que facilita la localización de los animales



Figura 7.- Sistema de plataforma informática a través del que los investigadores pueden solicitar servicios sobre los animales codificados.

Ventajas

- Es un sistema ágil de realizar: Un técnico experimentado puede hacer el trabajo de toma de muestras y el alta de ordenador en unos 10 minutos en una camada media de 7 animales. Esto en términos de eficiencia en el trabajo es muy importante. En 2013, se hicieron en nuestro animalario aproximadamente 5.000 destetes con este procedimiento.
- Este sistema de codificación, unido a una serie de servicios

estandarizados en el programa de gestión, permite un sistema de comunicación entre los laboratorios y el animalario ágil e inequívoco.

- La codificación da mucha información sobre el animal: a qué línea pertenece, si es un animal reciente del año o antiguo, qué marcas lleva el animal en su oreja...
- Sólo es necesario inmovilizar al animal una vez en su destete. La lectura no requiere inmovilización (ver Figura 8). El reducir la necesidad de inmovilizar a los ratones, contribuye decisivamente a mejorar el bienestar de los mismos [3].
- En nuestra experiencia con este sistema desde 2008, hemos tenido muy pocas confusiones en la interpretación de las marcas.
- La muestra de tejido es suficiente para el genotipado del animal en la gran mayoría de ocasiones.
- Permite tener bastante movimiento de animales entre jaulas. En nuestro centro se realizan muchos estudios de biología del desarrollo que implican datar gestaciones por medio de la observación del tapón vaginal. Esto conlleva mucho cambio de animales de distintas líneas entre jaulas, y este sistema nos permite seguir fácil e inequívocamente a los animales.

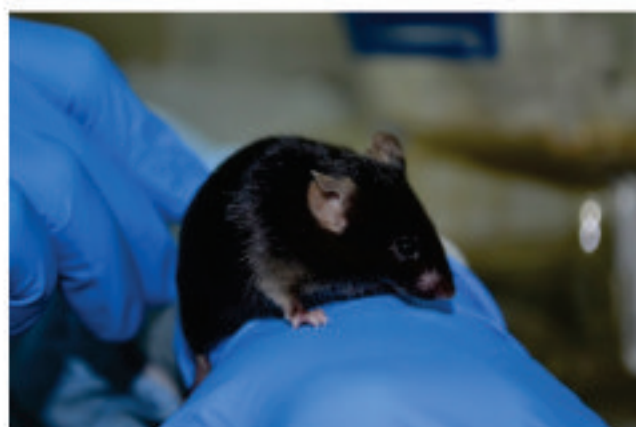


Figura 8.- No es necesario inmovilizar al animal para la lectura del código.

Inconvenientes

- El número 4 se puede cerrar con el tiempo.
- Puede haber alteración de las marcas por desgarros en las orejas durante el marcaje o peleas.
- No se puede realizar en animales menores de 2 semanas. Cuando es necesario marcar animales de menos de dos semanas recurrimos al tatuaje de dedos.

GENOTIPADO

El tejido recogido de la oreja es suficiente en un 95% de las ocasiones para realizar un genotipado convencional por PCR.

Materiales:

NaOH 50mM
Tris-HCl 1M
Trozo de tejido proveniente de marcaje del ratón
Kapa2G Readymix (2X) Fast hotstart
SYBR safe DNA stain

Procedimiento:**1. Obtención del DNA molde para PCR:**

Añadimos 100uL de NaOH 50mM al tubo con la muestra y nos aseguramos que el líquido cubra el tejido. Lo calentamos en un termobloque a 95°C durante 25 minutos. A continuación, neutralizamos con 100uL de Tris-HCl a 1M. Vortex y centrifugación a 13000 rpm. Ya tenemos el DNA molde.

Ventajas:

- Rápido y económico.

Desventajas:

- Es una extracción "sucía" que no sirve para rt-PCR u otros procedimientos.

2. PCR y visualización:

Preparamos la PCR, para lo que añadimos 18uL de mastermix Kapa2G 1,1X a un tubo de 0,2mL. A esto añadimos 1uL de mezcla de primers a 10uM y 1uL de DNA molde obtenido en la extracción anterior, y esta mezcla la llevamos al termociclador. Un programa estándar sería:

Desnaturalización inicial 95°C, 3 minutos
Desnaturalización 95°C, 15 segundos
Hibridación (T^a óptima de cada PCR) 15 segundos x 35 ciclos
Elongación 72°C, 20 segundos
Elongación final 72°C, 5 minutos

Para visualizar el producto de la PCR usamos un gel de agarosa al 2%, y como molécula de tinción añadimos SYBR Safe DNA stain.

Ventajas:

- Menor probabilidad de contaminación de materiales. Económico (el coste total por muestra es de unos 20 céntimos de Euro).
- Rápido (en menos de 3 horas puedes tener los resultados del genotipado desde la extracción a la visualización).
- No usamos Bromuro de Etidilo (menor generación de residuos peligrosos).
- Robusto. La tasa de repetición es menor del 3%.

BREVE BIBLIOGRAFÍA

1. Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, et al. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Laboratory Animals* 2013, 47:2.
2. Casanueva R, Velasco C, Sánchez S, y cols. Identificación y marcaje en roedores de laboratorio. *Animales de laboratorio* 2013, 57.
3. Cinelli P, Rettich A, Seifert B, et al. Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Laboratory Animals* 2007, 41:174.





Granja
San
Bernardo

*Minimal Disease
Level Rabbits*

New Zealand White Rabbit.
Total absence of all important rabbit disease germens
with specific sanitary garantees.

Ask our most recent guarantee table at
www.granjasanbernardo.com

Bienestar animal y emociones humanas

Javier Fidalgo

Socio-director en Ocelata consultores

No todos los trabajos generan la misma tensión ni exigen la misma implicación emocional. Hay casos en los que esto es evidente, como podría ser el de un cooperante en una situación de desastre humanitario o el de un soldado en una guerra.

Sin embargo, aquí quiero fijarme en aquellos otros en los que esa demanda emocional aun existiendo, por ser menos evidente, puede ser ignorada por el trabajador y tener consecuencias para él y su trabajo. Específicamente quiero centrarme en quienes tienen responsabilidades sobre un animalario.

Hace años, mis estudios de veterinaria exigían unas prácticas en un matadero. Para cuando llegó el momento de hacerlas, creo que en tercero de la licenciatura, ya había sido expuesto con curiosidad entusiasta (de hecho era la cirugía lo que más me atraía) a toda la dimensión gore de la práctica veterinaria. Las disecciones, sangre, vísceras, eventuales sacrificios o muertes los veía y comprendía científicamente.

Sin embargo, mi primera mañana en el matadero resultó distinto.

Me presenté al veterinario oficial que nos fue mostrando - éramos unos ocho estudiantes - las distintas dependencias. Llegamos a la sala de sacrificio y al entrar mi vista se topó con una estrecha hilera de terneros encajonados en fila india que avanzaban lentamente hasta el lugar donde eran efectivamente aturdidos y después desangrados hasta morir. Para mí, recién llegado, fue como un tortazo el palpable terror con que los terneros aguardaban mugiendo en fila su turno, construyendo un ambiente muy incómodo (un amigo, ajeno al mundo de la producción cárnica, después de visitar otro matadero lo calificó como *espeluznante*). Incomodidad, por cierto, al que los matarifes y el veterinario oficial parecían ajenos.

El caso es que yo mismo, sin ser consciente de ello, me alejé emocionalmente del sufrimiento que perciba y en cinco minutos recuperé la veterinaria compostura oficial.

Algunas corrientes de la psicología postulan que el ser humano posee mecanismos inconscientes de defensa psíquica frente a la ansiedad. Por ejemplo, uno de tales mecanismos es la "Proyección" que en palabras de Catherine Sandler consiste en que:

[El individuo niega parte de la realidad asociada a sentimientos y pensamientos amenazadores o dolorosos] conservando cierta conciencia de ello y, como resultado, experimenta cierta ansiedad. Típicamente, este es el caso del alcohólico que niega con agresividad tener un problema mientras que, al mismo tiempo, a otro nivel, sabe que sí es un problema y uno del que sentirse preocupado y avergonzado¹.

Otro es la "Escisión"

Esta defensa consiste en verse a uno mismo y a otros en términos de blanco y negro, normalmente como todo bueno y todo malo, aún cuando la realidad muestre otra cosa².

Tal es el extendido caso de culpar de toda la propia insatisfacción laboral al jefe/a (mi jefe es malo - yo soy bueno) para evitar enfrentarse al hecho de que al menos una parte de esa insatisfacción pueda ser responsabilidad de uno mismo.

Si bien tales mecanismos de defensa forman parte del funcionamiento normal del ser humano y tienen un efecto beneficioso, en ciertas circunstancias pueden convertirse en disfuncionales y resultar perjudiciales, impidiendo a la persona evaluar con una mínima objetividad a sí mismo, su entorno y a las relaciones establecidas con él.

Desde hace cincuenta años, la corriente psicodinámica de la psicología ha llevado a cabo muchos estudios sobre las condiciones de trabajo en ciertas organizaciones, de las defensas psíquicas que tales trabajos disparan en los trabajadores y de su efecto en el trabajo diario.

¹Sandler C. *Executive Coaching. A Psychodynamic Approach*. Berkshire, England: Open University Press, McGraw-Hill Education, 2011; 29.

²Ibidem

Factor Humano

Isabel Menzies³ fue pionera al estudiar de ese modo un entorno hospitalario. En los hospitales, los cuidadores (enfermeras, médicos) para hacer su trabajo deben compaginar y dar sentido a experiencias desasossegantes. Por ejemplo, la que supone atender a pacientes gravemente enfermos, de procurar ayudarlos pero convivir con el hecho de que, a menudo, no serán capaces de salvarles la vida o aliviarles el sufrimiento. Estas experiencias pueden llegar a ser tan dolorosas que las enfermeras activan mecanismos de defensa psíquica. Por ejemplo, distanciarse emocionalmente de los pacientes. Las enfermeras necesitan dosificar su empatía si quieren soportar esta tensión de forma continua y llevar a cabo las tareas asignadas.

Si bien, como ha quedado dicho, esta defensa psíquica basada en el distanciamiento emocional es normal y sana, en algunas circunstancias puede llegar a ser tan extrema que los pacientes se lleguen a sentir maltratados⁴. En otras palabras, la defensa psíquica inicialmente útil, se convierte en una causa que mina la esencia del trabajo de las enfermeras: cuidar al paciente.

Así, si las características que concurren en un trabajo son fuente de ansiedad, quien lo lleve a cabo, inconscientemente, se protegerá psíquicamente para no acabar deprimido, irritable, estresado o con cualquier otro efecto que un persistente nivel de ansiedad provoque.

Pensemos ahora en las circunstancias que parecen concurrir en un animalario. El cuidado⁵ de animales implica, al menos mínimamente, empatizar con ellos. Ahora bien, procurar el bienestar de animales cuyo destino es ser sacrificados, a menudo tras un sufrimiento, ¿no parece, al menos potencialmente, confuso? Más aún, ¿no es esperable que genere, en quien está involucrado en procurar ese bienestar, una experiencia de contradicción (*cuidar para hacer sufrir*) y como consecuencia cierta tensión emocional⁶.

Para quien trabaja en un animalario, una forma de protegerse frente a esa tensión puede ser, como en el caso de las enfermeras, poner cierta distancia emocional. Hasta aquí, todo bien. Pero si, inconscientemente, ese distanciamiento se extrema, la persona podrá llegar a negar, inconscientemente repito, que los animales

a su cargo tengan la capacidad de sentir y, mucho menos, sufrir. En último término se puede, defensivamente, cosificar a esos animales. Pensar en el bienestar de "una cosa" no tiene sentido, de manera que la contradicción experimentada desaparece. Ya no se trata de procurar bienestar a un ser vivo sino cuidar un objeto para que sea usado en investigación, como podría ser un matraz. Así, aunque se siga activamente llevando a cabo tareas como proveer de alimentación, limpieza, etc., se estará desconectado de la tarea *procurar bienestar* que requiere algo más que actividades de simple mantenimiento.

Ahora bien, como hemos visto, esta defensa no elimina la experiencia desasossegante de contradicción (*cuidar para hacer sufrir*) y cuando dicha defensa es exagerada, tendrá dos efectos:

- Aumentará la eventual tensión psíquica del trabajador (aunque deje de percibirse conscientemente) puesto que al ignorar su causa, la manera en que llevará a cabo el trabajo, desentendiéndose de la dimensión sentiente del animal, magnificará su experiencia del sinsentido de un trabajo en el que siente que los animales sufren "gratuitamente".
- El bienestar de los animales se resentirá, afectando eventualmente al rendimiento del animalario y, supongo⁷, a la calidad de la experimentación.

¿Cuál es entonces la forma de manejar esta situación? ¿Cómo compaginar el bienestar del trabajador y el de los animales de los que es responsable, consiguiendo algo suficientemente bueno para ambos, a la vez que el producto de su relación genera buenos resultados para la organización?

Desde un punto de vista psicodinámico, la solución pasa porque el trabajador gane consciencia sobre la forma en que se está relacionando con el trabajo y los animales a su cargo. Que reconozca entonces que su trabajo le podría generar cierto desasosiego porque manipula animales que sienten, pero que, aunque el destino de éstos no sea agradable, él puede darles todo el cuidado posible en su propio beneficio, el de los animales y el de la organización.

³Una breve reseña de ella puede leerse en el obituario del *The Guardian*: <http://www.theguardian.com/science/2008/feb/20/1>

⁴Existen bastantes estudios al respecto, véase por ejemplo, el descrito por Roberts V.Z. *The self-assigned impossible task*. En: Obholzer A. and Roberts V.Z. (Eds.) *The Unconscious at Work: Individual and Organizational Stress in the Human Services*. Londres: Routledge, 1994; 110-20.

⁵Por "cuidado" entendemos procurar bienestar.

⁶Salvo en los casos en los que la persona obtenga placer del sufrimiento ajeno.

⁷Dado que al cosificarlos los tratará peor.

⁸En un matadero, el maltrato animal antes del sacrificio merma la calidad de la carne producida y, por tanto, tiene una repercusión en el beneficio de la organización. En un animalario, supongo que un malestar persistente tendrá un indeseable efecto distorsionador sobre las investigaciones apoyadas en los animales.



Foto: Shutterstock

Un modelo al lado de los humanos

B6.129S7-App^{tm1Dbo}

Sus problemas de aprendizaje nos ayudan a que nosotros sigamos aprendiendo

En los últimos años, y gracias a la ingeniería genética, muchos grupos de investigación utilizan ratones transgénicos que exhiben algunos cambios patológicos asociados al Alzheimer. Estos ratones presentan niveles muy altos de la proteína amiloide β humana (gen *APP*, *amyloid precursor protein*) en su forma normal o mutada. Esto, les ocasiona trastornos cerebrales y problemas de aprendizaje similares a los que sufren los pacientes con Enfermedad de Alzheimer.



www.secal.es

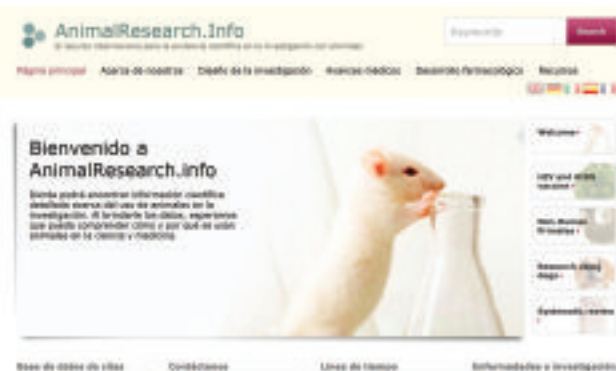
Necesarios y fundamentales

Daniel Baizán Vicent

El uso de animales en investigación siempre está en el punto de mira. La mejor forma de justificar su utilización es mostrar y demostrar que son imprescindibles.

El Bienestar Animal es una de las reglas obligatorias que están marcadas en rojo en cualquier investigación que requiera el uso de animales. Atrás quedan las dramáticas imágenes que aparecían sobre la investigación en las que los animales eran vilmente "torturados" en pro de la ciencia. A base de esfuerzos colectivos de las comunidades científicas, de la depuración de las técnicas y de los propios avances científicos hemos ido mostrando al mundo que los animales que obligatoriamente deben utilizarse en investigación, son los estrictamente necesarios y están perfectamente cuidados.

Partiendo de esta premisa siempre hay escépticos que dudan de ello. Por eso os voy a presentar www.animalresearch.info que da la bienvenida con una sencilla argumentación: "Donde podrá encontrar información científica detallada acerca del uso de animales en la investigación. Al brindarle los datos, esperamos que pueda comprender cómo y por qué se usan animales en la ciencia y medicina."



www.
animalresearch.
info

www.animalresearch.info

La página se presenta en cinco idiomas para su menú principal. En la parte superior encontramos las secciones por las que nos vamos a mover por la página. Su característica principal es que se trata de un tipo de base de datos. En las diferentes secciones, encontraremos un listado de artículos que nos van a aportar la información necesaria.

A la hora de navegar por la web, cada sección tiene una pequeña introducción sobre lo que nos vamos a encontrar. El ejemplo que voy a coger, siendo una página que pretende justificar el uso de animales en ciencia, es el apartado de animales de investigación.



Como bien argumenta la introducción del apartado "Los modelos animales tienen características físicas o sufren enfermedades similares a las que presentan los seres humanos. Éstos permiten realizar comparaciones entre la fisiología animal y humana, y contribuyen a que comprendamos cómo funciona el cuerpo humano. La biología comparativa estudia las diferencias y similitudes entre especies, permitiendo realizar predicciones y extrapolar conceptos de una especie a otra."

En este apartado encontraremos un listado de los animales que se utilizan en investigación. Al pinchar en cualquiera de los enlaces descubriremos una breve historia sobre el motivo del uso de ese animal y una serie de información básica sobre las necesidades y las variantes que hay sobre él. Además, al final de cada artículo encontraremos un enlace de referencia para obtener más información.

Otra de las secciones que me gustaría destacar es la de Premios Nobel. En ella encontramos un listado de descubrimientos y artículos relacionados con los animales de laboratorio que han escrito premios Nobel. Cada artículo viene datado, con los investigadores que han realizado el artículo y a los animales que afecta. Sin duda es una buena biblioteca de efemérides que nos va a servir para darle un toque de distinción a nuestros futuros artículos científicos o, simplemente, para aumentar nuestro conocimiento.



Proceso

El desarrollo del fármaco requiere tiempo y dinero. En promedio, el total del proceso varía entre 10 años y 15 años. Los procedimientos están estrictamente regulados, tanto en materia de seguridad como para garantizar que los fármacos sean efectivos. Los numerosos compromisos éticos son necesarios para garantizar un medicamento. El proceso de selección durante los fases de investigación incluye: los ensayos clínicos siguen un estándar investigativo: el fármaco se prueba en el ser humano. Así las cosas, muchos fármacos son retirados o retirados de forma que nunca llegan a entrar en el mercado como medicamentos. Algunos de los errores más comunes incluyen los efectos secundarios, el hecho de que el fármaco realmente afecta de lo que se pretende o la toxicidad excesiva.

Modelización informática

Finalmente, voy a hacer una mención a otra sección que considero fundamental para tratar de justificar, por si no fuese suficiente, el uso de los animales en investigación. Se trata del Desarrollo Farmacológico. En esta sección encontraremos una exposición clara y ordenada de la evolución de la investigación hacia el desarrollo de un fármaco. Es necesario que se dé a entender que para llegar a un remedio que mitigue o erradique una enfermedad es necesario mucho tiempo y mucho dinero, además del esfuerzo de muchas personas que caminan a ciegas y que, en innumerables ocasiones, se desesperan al no obtener resultados o cuando éstos son inexplicables.

Y si todavía hay tiempo para continuar investigando por la página, nos adentraremos en los Recursos. Citas, organizaciones de investigación, enlaces de interés o reseñas bibliográficas completan esta "web base de datos". El saber no ocupa lugar y además el hipertexto es infinito.



Enlaces

Titulo	URL
Who and why animal testing	www.org.uk/animal-testing-2012
Woods Center	www.org.uk/animal-testing/woods-center.html
Mathews Linnell	uk.gov.uk/animal-testing/linnell
European Agency for Medicines	www.ema.europa.eu/animal-testing.html

Cuando alguien pregunta si es necesario utilizar animales en investigación, ahora tenemos un recurso gráfico para indicarles. Seguramente, las personas que trabajan con animales de investigación sean los que más empeño ponen en evitar su uso y sufrimiento, pero las malas referencias les han colocado una letra escarlata imborrable. Cualquier apoyo para borrar ese estigma es de agradecer. Utilicemos las 3R's pero sobre todo, utilicemos la razón con nuestros animales.



PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

3

LOS ENSAYOS QUE INCLUYEN ANIMALES COMO MODELO EXPERIMENTAL DEBEN REALIZARSE EN ESTABLECIMIENTOS USUARIOS REGISTRADOS. LOS ANIMALES DEBEN PROCEDER DE ESTABLECIMIENTOS DE CRÍA REGISTRADOS, CON LA ÚNICAS EXCEPCIONES QUE SE CONTEMPLAN EN LA NORMATIVA VIGENTE.

Head office Castrop-Rauxel
Hermannstraße 2-8
44579 Castrop-Rauxel, Germany
phone +49 (0) 23 05 9 73 84-8
fax +49 (0) 23 05 9 73 84-44

Facility in Emmendingen
Fabrikstraße 2
79312 Emmendingen, Germany
phone +49 (0) 76 41 92 65-8
fax +49 (0) 76 41 47 97-2

Facility in Schönwede
Hauptstraße 61a
16348 Wandlitz, Germany
phone +49 (0) 3 38 56 8 13-11
fax +49 (0) 3 38 56 8 13-12

BIOSCAPE 
E B E C O + E H R E T F U S I O N



Full service lab animal technology

Representante en España:

Mari Carmen Viso

E-Mail maria-carmen.viso@bioscape.de

Teléfono + 34 6 55 76 38 28

Fax + 34 9 66 14 96 45

info@bioscape.de

-  Cages, racks for conventional animal husbandry
-  Ventilated systems + IVC cages
-  Individual cages
-  Cage systems
-  Transport + accessories
-  Washing, cleaning + decontamination

Y... ¿Para cuándo dice que los necesita?

Ernesto de La Cueva Bueno

Charles River España

El 15 de Enero, después de las vacaciones de Navidad, un investigador llega al animalario y nos entrega 8 ratones de la especie *Mus spretus* (5 ♂ y 3 ♀) que han sido capturados en la naturaleza con los correspondientes permisos de la administración. El investigador quiere derivar una línea consanguínea a partir de estos animales. No es un grupo de investigación que tenga mucha experiencia en aspectos genéticos o zootécnicos, por lo que acude a nosotros para pedirnos asesoramiento técnico sobre la viabilidad de su idea. Al parecer, le han concedido una beca durante 3 años y en principio le gustaría empezar sus experimentos, como muy tarde, a finales de año.

¿Y tú qué opinas?

¿Qué información indispensable necesitamos?

¿Cuánto tiempo tendrá que invertir en el proyecto?

¿Qué número de animales tendrá que emplear aproximadamente?

SOLUCIÓN

Antes de iniciar cualquier diseño de producción, necesitamos conocer una serie de parámetros zootécnicos indispensables para poder hacer una previsión lo más ajustada y real posible.

En nuestro caso concreto, es indispensable conocer aspectos fenotípicos de *M. spretus* y entre ellos, los parámetros reproductivos son básicos para nuestro encargo. En este sentido, consultamos la bibliografía¹ y observamos que:

- *M. spretus* (ratón moruno) es una especie de ratón silvestre ligada a ambientes mediterráneos semiáridos. En experimentación animal, se ha utilizado por su gran valor como fuente de polimorfismo. Representa también una fuente valiosa de variaciones morfológicas a nivel del cariotipo. De este modo, es fácil suponer que las líneas consanguíneas "salvajes" (el objetivo de nuestro investigador) son una herramienta fundamental para el clonaje posicional de genes, es decir, el clonaje de un gen que es conocido sólo por su fenotipo deletéreo.

- Madurez sexual de ♀ = 6-7 semanas.
- Madurez sexual ♂ = 8-9 semanas.
- Nº de embriones/camada = 2 - 10.
- % de reabsorción embrionaria = 1.57%.
- Nº de crías vivas al destete / ♀ = 6 (aprox).
- Duración gestación = 21 días.
- El tiempo intergeneracional (tiempo que transcurre desde que nace una camada hasta que esos individuos nacidos tienen una nueva descendencia) = 3-4 meses.



Estimación del tiempo necesario:

Decimos que una población es consanguínea cuando sus progenitores comparten uno o varios antecesores comunes. En otras palabras, la consanguinidad (o endocria) es el acoplamiento entre individuos emparentados. En nuestro caso concreto, sabemos que la consanguinidad de las poblaciones de *M. spretus* es frecuente en estado salvaje, debido a que viven en territorios relativamente pequeños y las migraciones son poco habituales. No obstante, no se lo podemos garantizar al 100% a nuestro investigador, ya que entre otros aspectos desconocemos dónde se han capturado, o si todos proceden de la misma área, ni las

¿Y tú qué opinas?

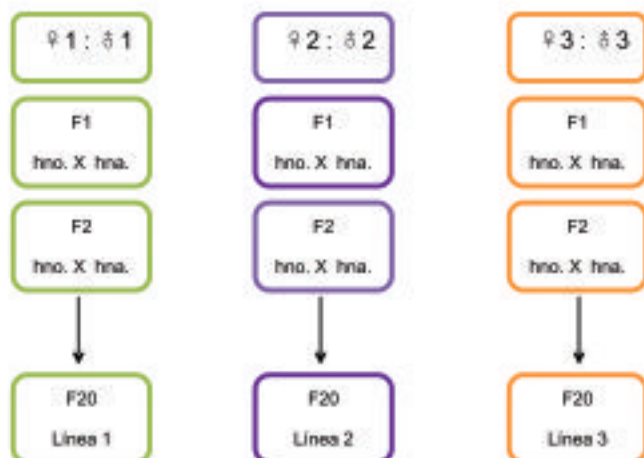
edades de cada uno, etc. Por lo tanto, tendremos que recurrir a la definición práctica de *línea* o *cepa consanguínea*, que dice que es aquella que resulta del acoplamiento sistemático e ininterrumpido entre hermanos y hermanas (en inglés, *full-sib mating*), por más de 20 generaciones¹ (que se numeran como F1, F2, F3, etc.). En este caso, se considera que el coeficiente de consanguinidad es del 98.7%. Para asegurar la consanguinidad de la línea, es muy importante que todos los animales desciendan de un único par de progenitores. En el caso de no disponer de hermanos de ambos sexos, se puede recurrir a un cruce excepcional (sólo una vez) del tipo padre/madre x hijo/a.

De este modo, y suponiendo que todo vaya bien, necesitaríamos 20 generaciones de cruces hno. x hna. con un intervalo entre generaciones de 3-4 meses. Esto nos da un tiempo total de 60 – 80 meses.

20 generaciones x 3 – 4 meses = 60 – 80 meses
(5 – 6 años aprox.)

Estimación del nº de cubetas y animales necesarios:

A la hora de comenzar y establecer el tipo de cruces, disponemos de varias alternativas, pero pensamos que la mejor manera de optimizar recursos y tiempos es emplear todas las hembras, ya que *a priori* desconocemos edad, fertilidad, grado de consanguinidad entre ellas, etc. De este modo, presupondremos que son hembras con diferente genotipo de las que obtendremos 3 líneas consanguíneas diferentes cuando las crucemos con 3 machos (presumiblemente diferentes).



Para ir decidiendo con qué línea nos quedaremos finalmente, en base al fenotipo expresado, características de manejo, etc., deberemos esperar al menos a las generaciones F5 – F8. Es en este periodo generacional, donde suelen aparecer los problemas de fertilidad por depresión endogámica. Por lo tanto, sería un riesgo desechar líneas en generaciones previas, sin saber cómo va a afectar la endogamia a sus parámetros reproductivos. Normalmente, pasado este periodo crítico, no suelen aparecer disminuciones de los índices reproductivos en generaciones posteriores.

De cada generación deberíamos mantener una cubeta de machos y otra de hembras, hasta asegurar descendencia. Además, podríamos considerar interesante el tener aislados a los machos reproductores. Teniendo en cuenta todo esto estableceríamos lo siguiente:

Mínimo 3 – 5 cubetas/generación/línea
3-5 x 20 x 3 = 180 – 300 cubetas

Por último, en cuanto al número de animales, y presuponiendo que llevaríamos las 3 líneas hasta la generación F20, lo estableceremos multiplicando las 20 generaciones de cada línea por el número medio de animales vivos al destete.

Nº generaciones x nº crías vivas/destete x nº líneas
20 x 6 x 3 = 360 ratones (aprox.)

BIBLIOGRAFÍA

1. Moriwaki K., Shiraishi T., and Yonekawa H. *Genetics in Wild Mice: its Application to Biomedical Research*. Tokyo: Japan Scientific Press and Basel, S. Karger, 1994.
2. Palomo J.L. *Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España* http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/leet_mami_mus_spretus_tcm7-22065.pdf
3. Benavides F.J. y Guénet J.-L. *Manual de genética de roedores de laboratorio*. Universidad de Alcalá de Henares, 2003.



www.vestilab.com

Member of the
ALSC/GO



Software para la gestión de animalarios

1 gestión del animalario más sencilla



2 que cumple con la nueva directiva

Tu solución para la nueva Directiva UE 2010/63

3 para cualquier tipo de animalario

desde centros individuales

a complejas redes institucionales

Violeta Solís Soto

*Responsable de Bienestar Animal
GlaxoSmithKline I+D, Diseases of the Development World
Centre, Departamento Laboratory Animal Sciences.*

¿Desde cuándo es socia de SECAL y qué opinión le deja nuestro colectivo?

Soy socia de SECAL desde 2002 (más o menos), y no tengo más que alabanzas para esta sociedad que es casi como una familia; desde el principio me sentí acogida y apoyada por todas las personas con las que tuve contacto. Creo además que la sociedad demuestra cada año que es capaz de superarse y está siempre en continua mejora, siendo un gran apoyo para todo el colectivo con las actividades que realiza, incluyendo la revista, por supuesto.

Entrando con historia y en relación al bienestar en el animal de laboratorio, ¿quiénes fueron los pioneros?

Aunque no específicamente en el campo del animal de laboratorio, sin duda un importante referente es Marian Stamp Dawkins. Esta etóloga fue pionera en entender que para hablar de bienestar tenemos que ponernos en el lugar de los animales y "preguntarles" qué es lo que necesitan y lo que quieren. Sus ideas se han aplicado para poder estudiar qué es importante para los animales y poder recomendar mejoras reales, por ejemplo, en el alojamiento.

Ya en el campo del animal de laboratorio, cabe destacar al equipo de Vera Baumans, que ha trabajado para mejorar el alojamiento de los animales de laboratorio, incluyendo el tema del enriquecimiento ambiental y de la gestión de los problemas de agresividad en el ratón. No podemos olvidar tampoco a David Morton, un "crack" en todo lo que respecta a asuntos prácticos de la gestión del bienestar del animal de experimentación: desde la evaluación del dolor y el estrés, pasando por mejora del alojamiento, los criterios de punto final humanitario, y un largo etcétera.

El bienestar animal está en boca de todos los que trabajamos en animalarios. ¿Qué definición de bienestar animal cree que se acerca más al animal de laboratorio?

Siguiendo el consejo de Dawkins, creo que es muy importante que tengamos en cuenta la perspectiva del animal.



Me gusta la definición de Duncan y Petherick (1991) que defienden que el bienestar animal depende principalmente de cómo se siente el animal y no tanto de otros factores. Sin embargo, en nuestro campo a menudo estamos limitados por el tiempo y no podemos dar una atención individualizada a nuestros animales. Saber cómo se siente un animal es complicado, por eso tenemos que utilizar parámetros menos complicados de cuantificar, como los desarrollados en las cinco libertades o ausencias (del inglés, *freedoms*): la ausencia de hambre y sed; la ausencia de incomodidades; la ausencia de dolor, lesión y enfermedad; la ausencia de miedo y angustia; y la capacidad de expresar una conducta normal.

¿Cree que el bienestar animal en nuestro medio responde más a un marco normativo, que a una necesidad científica?

En realidad creo que debería partir de la responsabilidad y la empatía hacia los animales con los que trabajamos. Tanto por el simple hecho de ser seres vivos que son capaces de sentir dolor, sufrimiento y también felicidad a su manera, como por la deuda que tenemos con ellos. Por otro lado, la necesidad científica está ahí y es fundamental porque nos da argumentos para convencer a aquellos para los que las prioridades son otras diferentes al bienestar animal. El marco normativo responde a una demanda de la sociedad europea de mejorar la protección a los animales de laboratorio y es algo que debemos cumplir, pero en un mundo ideal sería la consecuencia lógica de nuestra responsabilidad hacia los animales y de nuestra profesionalidad como investigadores. Esta normativa es esencial porque asegura unos mínimos independientemente del sentir de cada uno.

¿Considera entonces que el bienestar animal refina el uso de animales y da fiabilidad a los resultados de las investigaciones?

Sin duda ninguna.

El estrés, el dolor, el sufrimiento, la falta de estimulación... todo esto afecta a los animales y por tanto a su fisiología y comportamiento. No podemos pretender obtener resultados de calidad a partir de animales que no son "normales".

Y no sólo eso, la respuesta a estrés depende en gran medida del individuo, por lo que los diferentes animales van a reaccionar de manera desigual a una situación estresante y vamos a encontrarnos con una elevada variabilidad en la respuesta que no permitirá llegar a ninguna conclusión válida. Por ejemplo, hay un trabajo muy interesante de Verwer y colaboradores (2009) con conejos, en el que explican que los resultados que obtenían eran difíciles de interpretar debido a una elevada variabilidad en los datos experimentales. Una vez que aplicaron un protocolo mejorado de manejo y alojamiento, consiguieron que tanto la respuesta a estrés como la variación entre animales se redujeran, por lo que pudieron utilizar los resultados obtenidos con dicho protocolo.

Finalmente, qué consejos nos daría para interpretar más fácilmente en el animal la versión humana de "vaso medio vacío o medio lleno", y ponerlo en práctica dentro de nuestra valoración diaria del bienestar animal.

Interpretar el estado de ánimo de los animales no humanos es complicado porque no se comunican verbalmente como

nosotros. Para poder hacerlo es imprescindible conocer la conducta típica de la especie, y mucho mejor si además se conoce bien al individuo.

Los que tenemos animales en casa solemos reconocer cuando algo no va bien porque detectamos cambios en su conducta habitual, pero incluso así a veces se nos escapan y los problemas de salud pueden detectarse más tarde de lo que sería conveniente. Con los animales del laboratorio es aún más complicado porque a menudo no tenemos ese contacto tan cercano, especialmente en estudios cortos o con muchos individuos. Las observaciones sobre la conducta que se realizan habitualmente en los protocolos de supervisión, como la conducta espontánea o los cambios en la reacción a la manipulación, son las que nos pueden dar más información sobre el estado de ánimo de nuestros animales. Debemos preocuparnos si observamos a un individuo más pasivo de lo habitual, que no muestra interés ni curiosidad a lo que ocurre a su alrededor, que deja de jugar o rechaza los premios, por ejemplo. Pero claro, va a ser más difícil identificar esos cambios si no conocemos bien a nuestros animales. En este sentido, aumentar la complejidad del ambiente en el que alojamos a los animales (es decir, el enriquecimiento ambiental) puede ayudarnos a identificar cambios en el estado de ánimo de los mismos, al permitir que el animal desarrolle un mayor número de actividades, por lo que tendremos más oportunidades de identificar cambios en su conducta.



Powering your research development



Profesionales al servicio de la investigación

Servicios integrales para Animalarios

Externalización de servicios de Animalarios

Formación de personal

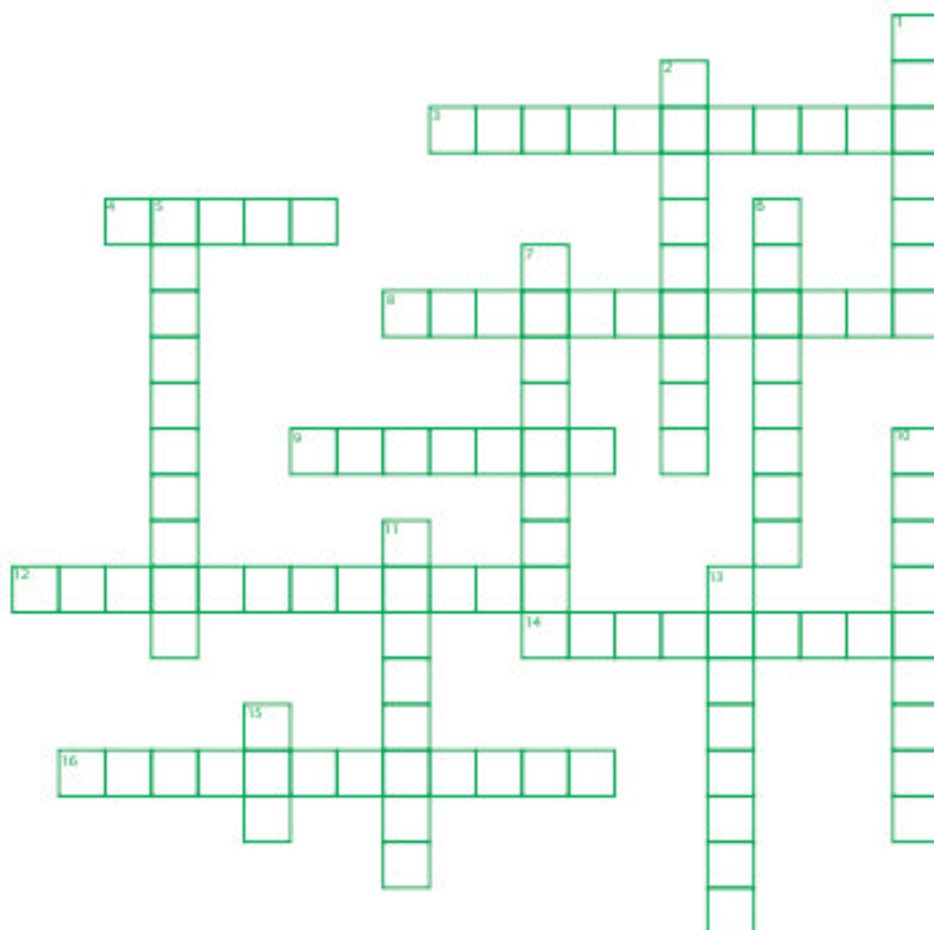
Diseño de Instalaciones

Alquiler y gestión de Instalaciones

Consultoría y Asesoramiento



www.vivotecnia-ms.com



Horizontal

3. Proceso neuronal mediante el que se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos para los tejidos.
4. Cada una de las formas alternativas de un gen que ocupa la misma posición en cada par de cromosomas homólogos.
8. Sistema de localización mediante coordenadas externas de zonas o tumores internos, para acceder a ellos de forma quirúrgica precisa.
9. Animal que se origina por la mezcla de células provenientes de especies diferentes y posee las características de los dos individuos que genéticamente lo originan.
12. Repetición constante y automática de movimientos, sin un fin determinado.
14. Se dice de todo lo que es nocivo o perjudicial.
16. "Limpieza" o descontaminación de una línea de ratón infectada.

Vertical

1. Uno de los anfibios más utilizados en investigación.
2. Sustancias secretadas con el fin de provocar comportamientos específicos en otros individuos de la misma especie.

5. Son cinco y han sido catalogadas como un marco de referencia importante para evaluar el bienestar animal.
6. Principio que supone que las sensaciones de las personas y los animales son análogas cuando muestran signos indicadores de falta de bienestar similares.
7. Grado de dolor, sufrimiento, estrés o daño duradero que se espera que experimente un animal durante el procedimiento.
10. Animal que difiere de otros animales de una misma cepa, por lo general en un solo gen mutante.
11. En roedores, lesión debida a baja humedad relativa, caracterizada por constricciones anulares de la cola que en situaciones graves pueden causar la pérdida de ésta (voz inglesa).
13. Catálogo de conductas que son típicamente presentadas por los individuos de una especie. Herramienta utilizada en estudios preliminares de conducta.
15. Técnica que utiliza un campo magnético y ondas de radio para crear imágenes detalladas de los órganos y tejidos en el cuerpo (en siglas).

DESCUBRA TODO lo que podemos entregar A SU EMPRESA

Anuncie Aquí

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO

ANIMALES DE LABORATORIO



www.secal.es





The Weight is Over.

No longer do you need to spend your time conditioning research models. There is now an immediate solution - Preconditioning Services from Charles River. Whether preparation for your study requires feeding special diets, aging of animals, phenotypic evaluations, or surgical manipulations, Charles River can provide you with animals preconditioned to your parameters and ready for use when they enter your facility.

For more information, please contact us at services@eu.crl.com



Referencias disponibles bajo demanda.

Rendimiento probado
de líneas celulares.

Tal como demuestran publicaciones de las más reconocidas instituciones investigadoras de todo el mundo, los modelos oncológicos de Harlan Laboratories ofrecen especificaciones de alta calidad, dietas y servicios de asistencia que pueden necesitar en su investigación contra el cáncer.

Para más información, visite nuestra Web www.harlan.com/oncology.

Modelos

Dietas

Servicios



www.harlan.com

©2010 Harlan Laboratories, Inc.
Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks of Harlan Laboratories, Inc.