

Clasificación e informe de la severidad experimentada por los animales empleados en procedimientos científicos: Informe del Grupo de Trabajo de FELASA/ECLAM/ESLAV

David Smith¹, David Anderson², Anne-Dominique Degryse³, Carla Bol⁴, Ana Criado⁵, Alessia Ferrara⁶, Nuno Henrique Franco⁷, Istvan Gyertyan⁸, José M^a Orellana⁹, Grete Ostergaard¹⁰, Orsolya Varga¹¹ and Hanna-Marja Voipio¹²

Del artículo original: Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. *Laboratory Animals* 2018. Vol. 52(1S) 5-57. DOI: 10.1177/0023677217744587 journals.sagepub.com/home/lan.

Abstract

La Directiva 2010/63/EU introdujo una serie de requisitos de aplicación para la clasificación de la severidad de los procedimientos, durante el proceso de autorización de los proyectos que utilicen animales en procedimientos científicos, así como la necesidad de informar sobre la severidad real experimentada por cada uno de los animales empleados en dichos procedimientos. Estos requisitos ofrecen la oportunidad, durante el diseño y el desarrollo de los procedimientos y el posterior informe sobre los mismos, de considerar los efectos adversos de los mencionados procedimientos y cómo estos pueden reducirse para minimizar sus consecuencias sobre el bienestar de los animales. Un mejor registro e informe sobre los efectos adversos, también debería contribuir a subrayar las prioridades para el refinamiento en el futuro de procedimientos similares, así como constituir un referente de buenas prácticas. El informar sobre la severidad real debe ayudar a concienciar a la opinión pública de la relativa severidad que implican las diferentes áreas de la investigación científica y, a largo plazo, podría mostrar unas pautas de refinamiento. Es un requisito clave que haya una consistencia en la asignación de las categorías de severidad por parte de todos los Estados miembro, en particular si se considera la reutilización de los animales, o en caso de que se alegue la cláusula de salvaguardia. Los ejemplos de la clasificación de la severidad que se incluyen en el Anexo VIII son limitados en número y tienen poco poder descriptivo para ayudar a la asignación. Asimismo, los ejemplos dados a menudo se refieren al procedimiento y no intentan evaluar los resultados, como los efectos adversos que puedan ocurrir. El objetivo de este informe es proporcionar unas pautas para la asignación de severidad, tanto de forma previa como al terminar un procedimiento. Se han incluido modelos animales, utilizados actualmente, para ilustrar el proceso de evaluación de la severidad, desde el inicio del proyecto, durante la monitorización en el transcurso del procedimiento y hasta la evaluación final de la severidad real al término de este (Apéndice 1).

¹ FELASA, Federation for Laboratory Animal Science Associations, Eye, Suffolk, Reino Unido.

² LASA, PO Box 524, Hull, HU9 9HE, Reino Unido.

³ Domaine de Mirabel, Puy-laurens, Francia.

⁴ Laboratorios Charles River, 's-Hertogenbosch, Países Bajos.

⁵ Via Fleming 4, Verona, Italia.

⁶ Aptuit, Verona, Italia.

⁷ Instituto de Investigacao e Inovacao, Universidade do Porto, Portugal.

⁸ Universidad de Semmelweis, Budapest, Hungría.

⁹ Universidad de Alcalá, España.

¹⁰ Universidad de Copenhague, Dinamarca.

¹¹ Universidad de Debrecen, Hungría.

¹² Universidad de Oulu, Finlandia.

Palabras clave

Animales, severidad, punto final humanitario, refinamiento, ética & bienestar, procedimientos

Introducción

La implementación de la Directiva 2010/63/EU ha impuesto requisitos adicionales relacionados con la severidad de los procedimientos practicados a animales con fines científicos. Los procedimientos deben recibir una clasificación de severidad de forma prospectiva, y la severidad real experimentada por cada uno de los animales durante el curso de un procedimiento debe determinarse y comunicarse como parte de la información estadística que debe hacerse pública anualmente (Decisión de aplicación de la Comisión 2012/707/EU, modificada por 2014/11/EU).^{1,2}

Una buena planificación del proyecto es necesaria para determinar una clasificación prospectiva de la severidad, para desarrollar los métodos apropiados de observación, así como criterios de evaluación y punto final humanitarios adaptados al estudio.^{3,4} Disponer de un personal suficientemente formado y competente es un requisito indispensable para evaluar el bienestar animal durante el curso del estudio.

Se necesita una estrategia de observación y un sistema de registro común, que recopile todos los datos necesarios en un formato coherente para facilitar la aplicación continuada del refinamiento y permita la evaluación de la severidad real. Este artículo discute las razones por las que una evaluación de estas características es necesaria y quién es la persona responsable de llevarla a cabo. A continuación, se desarrollan varios ejemplos de procedimientos animales reales de cómo hacerlo y cómo ello permite la evaluación de la severidad real mediante puntuación para cada uno de los animales que ha sido sometido a los procedimientos.

El Anexo VIII de la Directiva ha incluido algunas pautas adicionales para la clasificación prospectiva de la severidad con el objeto de ayudar a alcanzar una interpretación común de las intenciones de la Directiva.

Los ejemplos proporcionan poca información sobre cómo se llegó a la clasificación de severidad y dan una combinación de procedimientos sencillos por pasos, como por ejemplo el confinamiento por poco tiempo en una jaula metabólica, o procedimientos más complejos con múltiples etapas, tales como el trasplante de órganos requiriendo anestesia, la cirugía y cómo actuar en el rechazo de un órgano.

Aunque los criterios de asignación (establecidos en la Sección II del Anexo VIII) indican que cada proyecto necesita considerar una serie de factores antes de determinar una clasificación, muchos miembros de la comunidad científica han manifestado su preocupación acerca de que los ejemplos incluidos en el Anexo VIII contengan información una insuficiente para explicar de forma satisfactoria la clasificación de la severidad, así como que no se incluyan ejemplos de algunas importantes áreas de la investigación, como por ejemplo el dolor y la artritis. A falta de una explicación adicional, es probable que haya considerables diferencias en la asignación de la severidad, lo que podría finalmente proporcionar información errónea sobre el uso del animal y, lo que es más preocupante, en la reutilización indebida de los animales. Otra preocupación potencial relacionada con los modelos de dolor animal es que se puede categorizar el mismo modelo abarcando al menos dos clasificaciones de severidad, dependiendo del refinamiento aplicado al procedimiento. Además, con la aplicación del punto final temprano, el grado de atenuación del dolor, angustia y sufrimiento es un factor determinante.

En 2012, miembros del grupo de trabajo FELASA/ECLAM/ESLAV contribuyeron en una reunión organizada por la Comisión Europea al debate sobre la clasificación de severidad y, utilizando material desarrollado por este grupo, colaboraron en la elaboración de algunas pautas adicionales. Asimismo, contribuyeron con algunos ejemplos de clasificación de la

severidad que fueron aprobados durante una reunión del National Contact Point (NCP) y que pueden consultarse en la web de la Comisión Europea.⁵

Uno de los principales objetivos de este informe conjunto de FELASA/ECLAM/ESLAV es el de proporcionar información adicional y unas pautas para la clasificación prospectiva de la severidad y para la evaluación de la severidad experimentada por los animales en el curso de un procedimiento (severidad real) por medio de una serie de ejemplos ilustrativos en diferentes campos de la investigación, tomando como base sistemas existentes, proporcionando ejemplos de diferentes tipos de severidad y ampliando los ejemplos incluidos en el Anexo VIII. Se ha incluido deliberadamente una serie de modelos “severos” para ilustrar áreas de utilización de animales en la labor científica no contempladas en el Anexo VIII, con el objetivo de fomentar que se compartan y diseminen las buenas prácticas.

Se han elegido modelos que, en el momento en el que se elaboraba este informe, estaban en uso en la investigación básica y aplicada, así como algunos ejemplos usados para evaluar la seguridad. Los ejemplos incluyen *alguna* información acerca de cómo puede reducirse la severidad mediante la aplicación de estrategias de refinamiento. Se incorporaron sugerencias adicionales para el refinamiento tras la revisión del texto a instancias de las organizaciones convocantes.

Aunque los ejemplos son representativos de prácticas actuales, el principio sigue siendo que siempre que se proponga un modelo animal, cada parte del estudio debe ser revisada y ponerse a prueba, siempre que sea posible, para garantizar la aplicación de las 3 Erres.

Con estos requerimientos adicionales introducidos en la 2010/63/EU, es importante que todos aquellos implicados en el uso de animales, incluyendo los responsables de la evaluación del proyecto, desarrollen y acuerden un entendimiento y enfoque común de la “clasificación de severidad” con el objeto de promover una “igualdad de condiciones” en toda la comunidad investigadora europea. Esto debería garantizar la coherencia al informar sobre la severidad experimentada por los animales durante los procedimientos y en las estadísticas sobre el uso de los mismos.

El marco regulador

La Directiva 2010/63/EU sobre la protección de animales utilizados con fines científicos se aprobó el 22 de septiembre de 2010 y entró plenamente en vigor en los Estados miembro el 1 de enero de 2013.

Como en el caso de la Directiva 86/609/EEC, la nueva Directiva requiere que los experimentos sean diseñados para causar el menor dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero posible.

Todos los procedimientos científicos se llevarán a cabo en cada Estado Miembro (EM) con la autorización de su autoridad competente (AC). Quienes soliciten la autorización para un proyecto deberán incluir una estimación de la severidad esperada en cada uno de los procedimientos. Estas estimaciones de la severidad serán tomadas en consideración por la autoridad competente durante el proceso de evaluación del proyecto, antes de que se tome una decisión o se autorice el mismo. Una vez considerada la información proporcionada en la solicitud, la autoridad competente asignará la clasificación de severidad a cada uno de los procedimientos (Artículo 38).

Cada uno de los Estados miembro informará anualmente de la severidad real experimentada por cada uno de los animales durante cada uno de los procedimientos (Artículo 54(2)) en el año en el que se complete el procedimiento.

Asimismo, la **severidad real** experimentada por un animal en cualquiera de los procedimientos anteriores será una consideración clave a la hora de determinar si un animal puede ser reutilizado en futuros procedimientos (Artículo 16). Los animales sólo serán reutilizados a condición de que la severidad del procedimiento anterior haya sido “leve” o

“moderada”; que el estado de salud general y bienestar del animal se haya recuperado por completo; que el subsiguiente procedimiento esté clasificado como “leve”, “moderado” o “sin recuperación” y que se realice con la aprobación de los veterinarios, habiendo tenido en cuenta la experiencia durante toda la vida del animal. La experiencia durante toda de vida del animal incluye todos los aspectos de salud, bienestar y cuidados y el impacto de todos los procedimientos científicos. La combinación de todos estos efectos puede considerarse como severidad “acumulada”. En circunstancias excepcionales, por derogación por parte de la autoridad competente y tras examen veterinario, un animal que haya experimentado previamente dolor, angustia o sufrimiento severos podría ser reutilizado.

El Artículo 3 define un procedimiento como *“cualquier utilización invasiva o no invasiva de un animal para fines experimentales u otros fines científicos, con resultados predecibles o impredecibles, o para fines educativos, que pueda causarle un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero, equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja, conforme a la buena práctica veterinaria”*.

Ello define para un procedimiento científico, un “umbral” más bajo por debajo del cual no será necesaria la autorización del proyecto. Esta definición proporciona una indicación del nivel de dolor que puede considerarse como “umbral”, pero no da ninguna información sobre umbrales equivalentes de sufrimiento, angustia o daño duradero.

Desde la adopción de la Directiva, la UE ha desarrollado unas pautas para la evaluación de la severidad aprobadas en 2012. Con vistas a promover la coherencia de los informes se incluyó además información adicional en un documento de debate surgido de la reunión de los National Contact Points en enero de 2016.^{6,7}

¿Por qué necesitamos un sistema de clasificación de la severidad?

La inclusión de un sistema de clasificación en la nueva Directiva nos proporciona la posibilidad de aplicar continuamente el refinamiento desde el comienzo hasta la finalización de un procedimiento, mejorando la calidad de la ciencia y del bienestar animal. Mediante la inclusión en los Informes Estadísticos de la severidad real experimentada por cada uno de los animales durante un procedimiento, se proporciona una mayor transparencia y se fomenta la confianza de la opinión pública respecto al empleo de animales en investigación. Con el paso del tiempo, estas publicaciones podrán proporcionar además una información sobre los patrones de refinamiento.

Una serie de países europeos, entre ellos, Finlandia, Alemania, Irlanda, Países Bajos, Polonia, Suecia, Italia, Suiza y Reino Unido, así como Australia, Canadá y Nueva Zelanda ya llevan años utilizando sistemas para clasificar la severidad de los estudios con animales.

Muchos de los sistemas existentes ya informan prospectivamente con un número de categorías entre 3 y 9.⁸ No obstante, ninguno de estos sistemas considera la combinación de sufrimiento prospectivo, real y acumulado, o las clasificaciones incluidas en la nueva Directiva.

Es necesario asignar una clasificación prospectiva, así como informar sobre la severidad real, para posibilitar una comparación al hacer la revisión retrospectiva de un proyecto, cuando se requiera dicha revisión.

Las categorías de severidad se definen en el Anexo VIII de la Directiva del siguiente modo:

La severidad de un procedimiento estará determinada por el grado de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que se prevé que experimente un animal individualmente durante el procedimiento.

Sin recuperación:

Los procedimientos que se realizan en su totalidad bajo anestesia general de la cual el animal no recupera la consciencia, deben clasificarse como «sin recuperación».

Leve:

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

Moderado:

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

Severo:

Los procedimientos a consecuencia de los cuales es probable que los animales experimenten dolor, sufrimiento o angustia intensos, o moderados pero duraderos, así como los procedimientos que pudieran causar una alteración grave del bienestar o del estado general de los animales, deben clasificarse como «severos».

Nota: Existe la posibilidad de que los Estados Miembro, por razones excepcionales y justificadas científicamente, adopten una medida provisional para permitir el uso de animales en un procedimiento que implique dolor, sufrimiento o angustia severos, con la probabilidad de que estos sean de larga duración y que no haya posibilidad de atenuarlo. Cualquiera de estas medidas provisionales deberá ser considerada y aprobada por un comité de la UE para que dicho trabajo pueda continuar (Artículo 55).

Deberá proporcionarse una estimación de la severidad que se espera que los animales experimenten en cada uno de los procedimientos científicos. Este requisito proporciona una oportunidad, durante la fase de diseño del estudio, para considerar la aplicación de las 3Rs y asegurar que la severidad se reduzca todo lo posible dentro de las limitaciones científicas del estudio.^{9,10}

Por lo tanto, tener en cuenta la severidad debe beneficiar a los animales al reducir su sufrimiento, pudiendo mejorar también la solidez del diseño del estudio. Al dar la oportunidad de considerar los efectos de los procedimientos sobre, por ejemplo, la fisiología o el comportamiento en aquellos casos en los que, por ejemplo, un estado deteriorado de la salud o del bienestar pudieran afectar los resultados. También indican la forma en las que estos efectos pueden ser minimizados para mejorar la calidad y coherencia de los datos.

Asimismo, la clasificación ayudará a definir claramente unos límites máximos de sufrimiento del animal y, por lo tanto, contribuir a la implementación del punto final humanitario.

Las 3Rs deberían seguir siendo revisadas a medida que el proyecto se desarrolle, tanto por parte de las personas directamente implicadas en el uso de animales, como por el Órgano Encargado del Bienestar de los Animales (tal y como se detalla en el Artículo 27 de la Directiva).

En los casos en los que se requiera, la evaluación retrospectiva del proyecto proporcionará una nueva oportunidad para revisar las consecuencias/daños para el bienestar de los animales, de determinar si se han cumplido los objetivos previstos y de reconsiderar si la clasificación de la severidad fue la apropiada, antes de llevar a cabo cualquier futuro estudio.

¿Quién determina la clasificación de severidad?

La solicitud para la autorización de un proyecto por parte del usuario o de la persona responsable del proyecto requiere la inclusión de una propuesta de clasificación de la severidad para cada procedimiento (Anexo VI).

La autoridad competente que lleve a cabo la evaluación del proyecto (Artículo 38) deberá incluir un *“una evaluación y una asignación de la clasificación de la severidad de los procedimientos”*. La autoridad competente considerará la participación de expertos en esa área científica, el diseño del experimento, la práctica veterinaria con animales de laboratorio o en animales silvestres y el cuidado y prácticas ganaderas, según proceda en relación con la propuesta de proyecto.

La autoridad competente asignará la clasificación de severidad prospectiva del procedimiento durante la evaluación del proyecto, basándose en el efecto más severo que sea probable que experimente al menos uno de los animales utilizados en el mismo, una vez que se haya aplicado el correspondiente refinamiento.

El Órgano Encargado del Bienestar de los Animales (Artículos 26 y 27) tiene la obligación de supervisar el desarrollo y resultados de los proyectos y de aconsejar respecto de la aplicación de las 3Rs en los mismos.

Los Estados Miembro informarán de la **severidad real** de los procedimientos en el informe estadístico anual. Este reflejará la severidad máxima experimentada por el animal como consecuencia del procedimiento. Tal información será proporcionada por el usuario o la persona responsable del proyecto, que habrá sido mantenido informado por los investigadores, cuidadores, veterinario/expertos cualificados intervinientes en el proyecto.

Se espera que los Comités Nacionales para la protección de animales utilizados en procedimientos científicos (Artículo 49) promuevan y compartan las mejores prácticas dentro de la Unión Europea. Un aspecto importante de su labor será la de fomentar la congruencia en lo referente a la evaluación de severidad.

Terminología

Se hace necesaria una cierta clarificación y estandarización de la terminología, con el fin de asegurar que se comparte un mismo método para la evaluación y asignación de la clasificación de la severidad.

El Grupo de Trabajo Técnico de Expertos (TEWG) convocado por la Comisión Europea en 2003 para considerar varios aspectos de la composición de la nueva Directiva, hizo varias recomendaciones con respecto a la terminología que debería usarse. Estas no se han transpuesto directamente y la falta de mayores explicaciones en el Anexo VIII ha contribuido a que haya más confusión sobre qué aspectos de los procedimientos (dentro de un proyecto) deben ser evaluados para la severidad.

Directiva 2010/63/EU – Artículo 3

“Procedimiento” significa cualquier utilización invasiva o no invasiva de un animal para fines experimentales u otros fines científicos, con resultados predecibles o impredecibles, o con fines educativos, siempre que pueda causarle un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero, equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja, conforme a la buena práctica veterinaria.

Esto incluye cualquier actuación que, de manera intencionada o casual, provoque o pueda provocar el nacimiento o la salida del huevo de un animal o la creación y mantenimiento de una línea de animales modificados genéticamente en las condiciones de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero citadas en el párrafo anterior, pero excluye la eutanasia de animales con el único fin de utilizar sus órganos o tejidos.

“Proyecto” significa un programa de trabajo con un objetivo científico definido y en el que se realicen uno o varios procedimientos.

La recomendación desde el TEWG fue la de separar la definición de “proyecto” de la de “experimento” y que el término “procedimiento” se utilizara en lugar de “experimento” con el objeto de que incluyera tanto los procedimientos con resultados conocidos (por ejemplo, procedimientos relacionados con la producción de anticuerpos) como con resultados desconocidos (por ejemplo, un procedimiento llevado a cabo para probar una hipótesis). Este último concepto fue incluido, pero no se incluyó la siguiente recomendación:

<p>Técnica: Un acto técnico llevado a cabo en uno o más animales con un propósito experimental o de otro tipo científico y que podría causar al animal o a los animales dolor, sufrimiento, angustia, o daños duraderos. Algunos ejemplos pueden ser la administración oral con sonda, una inyección, una laparotomía o una restricción de comida/agua.</p> <p>Procedimiento: Una combinación de uno o más actos técnicos llevados a cabo en un animal con un propósito experimental u otro propósito científico y que podrían causar al animal dolor, sufrimiento, angustia, o daños duraderos.</p> <p>Proyecto: Un coherente programa de trabajo cuyo objetivo sea alcanzar un objetivo u objetivos científicos concretos y que implique una combinación de uno o más procedimientos.</p>

En una reunión del NCP celebrada en octubre de 2011, se prefirió el concepto de “procedimiento” de una sola etapa o de múltiples etapas al de “técnica” ya que este término no figura en la Directiva.

El término “procedimiento” debería, por lo tanto, ser utilizado para describir la *completa* serie de etapas (*técnicas*) que deben seguirse para cumplir un determinado propósito experimental o de otro tipo científico. Algunos procedimientos puede que incluyan un solo paso (*técnica*) por ejemplo, la extracción de sangre de un animal “normal” para permitir un estudio *in vitro*, pero la mayoría incluirán una serie de pasos (*técnicas*) por ejemplo, un estudio de vacunas podría englobar la inoculación de la vacuna, exposición a un agente infeccioso y la toma de muestras o biopsia de tejidos.

El Anexo VIII de la Directiva proporciona una serie de ejemplos de diferentes tipos de procedimientos para las diferentes categorías de severidad, e incluye una combinación de procedimientos de una sola etapa y de múltiples etapas.

Para determinar la severidad de un procedimiento, será necesario considerar la contribución de cada una de las etapas (*técnicas*) y las consecuencias de cada etapa, a la severidad total de dicho procedimiento. Por ejemplo, al inyectar una sustancia, debe considerarse por un lado el impacto de la inyección en sí, pero también cualquiera de los efectos subsiguientes de la sustancia que se inyecte.

Clasificación prospectiva de severidad

La clasificación final de un procedimiento estará determinada por los efectos más severos que se espere que sean experimentados por **cualquiera** de los animales – lo que proporciona una estimación prospectiva del nivel más alto de sufrimiento que es probable que cualquiera de los animales experimente como parte del procedimiento. Esta información puede ser de ayuda a la hora de determinar una adecuada estrategia de seguimiento de los animales y para definir el momento de punto final.

Informe de la severidad real

A diferencia de la clasificación prospectiva, la severidad real (más alta) experimentada por **cada uno** de los animales durante el curso del procedimiento, tendrá que determinarse

empleando las observaciones registradas durante el curso del procedimiento, reflejándose más tarde esta severidad real en las estadísticas anuales.

Por lo tanto, probablemente habrá diferencias entre la clasificación prospectiva de la severidad del procedimiento y la severidad real informada para cada uno de los animales utilizados en el procedimiento.

“Por debajo del umbral” para la regulación

La Directiva 2010/63/EU define un procedimiento como *“una intervención que pueda causar al animal un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duraderos, equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja, conforme a la buena práctica veterinaria”*.

El Anexo VIII proporciona algunos ejemplos que están por debajo de este umbral. Estos incluyen la mínima inmovilización de animales previamente habituados, la aplicación de aparatos telemétricos externos, una mínima manipulación de la dieta, incluyendo las variaciones en su composición y disponibilidad, siempre a condición de que no se espere que causen ningún efecto adverso.

El Anexo también apunta que necesita tenerse en cuenta que la repetición o combinación de varias intervenciones “por debajo del umbral” puede tener un efecto acumulativo que lleve a que la clasificación del procedimiento sea “leve o más alto”.

Por ejemplo, algunas investigaciones científicas para el desarrollo de nuevas prácticas ganaderas que comprenden cambios significativos en la frecuencia de limpieza y perturbaciones de los grupos sociales pueden causar sufrimiento y angustia y, por lo tanto, deberían requerir autorización de proyecto.

Evaluación de la severidad de los procedimientos y valoración de los daños y beneficios del proyecto

El análisis entre los daños y los beneficios que se requiere para la evaluación del proyecto (Artículo 38) tomará en consideración la probabilidad del impacto sobre los animales utilizados en el proyecto, y por ello necesita tener en cuenta todos los daños potenciales a todos los animales.

Por el contrario, la clasificación de severidad de cada uno de los procedimientos dará una indicación del límite de sufrimiento infligido a *cada uno* de los animales utilizados en el procedimiento.

Por consiguiente, la información necesaria para la evaluación de un proyecto necesita contener más detalles sobre los perjuicios sobre el bienestar de todos los animales, que la mera clasificación de la severidad aplicada a los procedimientos de los que se compone el proyecto.

Por ejemplo, en un estudio de vacunas, algunos animales (animales de control sin vacunar) puede que experimenten una enfermedad clínica severa, lo que requiere asignar la clasificación “severa” al procedimiento.

No obstante, sería de esperar que la mayoría de los animales a los que se administre una vacuna efectiva no experimenten más que efectos adversos “leves”.

Se hace necesario este conocimiento detallado del impacto probable en todos los animales que van a ser utilizados en un procedimiento, para que sea posible un análisis real del daño/beneficio.¹⁰

En el ejemplo anterior, donde el proyecto consiste en desarrollar una nueva vacuna contra una enfermedad que está asociada con una alta mortalidad, es probable que el análisis de daños/beneficios esté a favor del proyecto. Naturalmente esto dependerá de la consideración de otros muchos factores, tales como la experiencia y la implementación de las 3Rs en los procedimientos.

Planificando un procedimiento

El solicitante debe discutir la propuesta de proyecto con el veterinario (o un experto debidamente cualificado, según proceda) el personal encargado de los cuidados y/o el OEBA, para considerar los procedimientos que se van a aplicar y las oportunidades para implementar las 3Rs, por ejemplo unas estrategias apropiadas para la administración de la dosis y extracción de muestras, y para acordar criterios apropiados de monitorización/evaluación, intervenciones para minimizar el sufrimiento y, cuando corresponda, la aplicación del punto final.

Todos aquellos implicados en la evaluación de la severidad deberían conocer el comportamiento y bienestar animal, así como de los indicadores de deficiencias en el bienestar, el dolor y el sufrimiento en las especies que se vayan a utilizar.⁴

Este proceso asegura que todo el personal implicado en los estudios tenga una oportunidad de contribuir al diseño del estudio, y garantizar que todos sean conscientes de los efectos potencialmente adversos, el sistema de seguimiento del animal que se empleará y los métodos que se utilizarán para minimizar el sufrimiento.

Es necesario un trabajo en equipo eficiente entre todos los implicados, para garantizar una interpretación coherente y que minimice el sufrimiento de forma compatible con los objetivos científicos.

Formación para la evaluación de la severidad

Aunque el responsable del proyecto será el encargado de transmitir los datos de la severidad real a la autoridad competente, a menudo la evaluación de la severidad real la llevarán a cabo aquellas personas directamente implicadas en la puesta en práctica de los procedimientos y la observación y cuidado de los animales.

Por lo tanto, es esencial asegurar que todos los implicados han sido formados adecuadamente y que tengan un buen conocimiento del comportamiento normal y anormal de la especie/cepa que se vaya a utilizar.

¿Cómo debe evaluarse la severidad?

Clasificación prospectiva de severidad de los procedimientos

Para determinar la clasificación de severidad apropiada para un procedimiento deben tenerse en cuenta numerosos factores.

Aunque la evaluación es en gran parte subjetiva, a medida que se va disponiendo de más información científica, nuestra capacidad para identificar el dolor, sufrimiento y angustia va mejorando y, por lo tanto, es importante mantenerse al día respecto a los avances en ese campo de investigación que se desarrollan a tanta velocidad.

En el Anexo VIII de la Directiva 2010/63/UE y en el marco de evaluación de la severidad aprobado por la UE se incluyen algunos ejemplos de clasificaciones de la severidad de procedimientos.

A la hora de determinar una clasificación de severidad apropiada, es necesario considerar el impacto en los animales durante todas las etapas del procedimiento planeado:

- ¿Qué se les está haciendo a los animales?
- ¿Qué efecto tendrá en ellos?
- ¿Cuánto sufrimiento puede causarles?
- ¿Qué intervenciones se pueden incluir para reducir el impacto en los animales?

(i) ¿Qué se les está haciendo a los animales?

Considere todas las etapas de las que se compone el procedimiento:

- Cambios en el entorno normal, mantenimiento y cuidados.
- Condicionamiento/entrenamiento; manejo e inmovilización.
- Administración/inyección de sustancias – vías, volúmenes, frecuencia.
- Obtención de muestras: Qué se toma como muestra, de dónde se toman muestras, qué cantidad y con qué frecuencia se toman.
- Cirugía y otras intervenciones invasivas.
- Uso de anestesia: Local, general, regional y/o analgesia.
- Duración del estudio.
- En el caso de trabajar en la naturaleza: Método y frecuencia de la captura, captura accidental de especies ajenas al estudio, alojamiento temporal, etc.

(ii) ¿Qué efecto tendrán estas intervenciones en los animales?

Los cambios en el entorno, en la cría y en el cuidado pueden tener un impacto inicial en el bienestar del animal y producir cambios en su comportamiento (por ejemplo, incremento de las agresiones) pero el habituar a los animales reducirá la angustia potencial.¹¹ Lo mismo se aplica a los procedimientos de manipulación e inmovilización. El comportamiento condicionado de los animales, como por ejemplo la adaptación al manejo o el entrenamiento mediante un refuerzo positivo estructurado puede preparar mejor a los animales para los procedimientos y mitigar estos efectos.

La administración de sustancias y la toma de muestras pueden tener un impacto negativo en el bienestar a corto o largo plazo, dependiendo de las vías, volúmenes y efectos de las sustancias administradas.

Las intervenciones quirúrgicas con toda probabilidad causarán dolor, incluso con unos buenos cuidados perioperatorios (uso de analgésicos incluido).

(iii) ¿Cuánto sufrimiento pueden causarles estas intervenciones?

Deben tenerse en cuenta individualmente todos los elementos y cómo van a interactuar.

La naturaleza, intensidad y duración de cada intervención tendrá un impacto en la severidad en su conjunto.

También deben ser consideradas la frecuencia de las intervenciones y el tiempo de recuperación entre las mismas.

La duración del estudio es un factor importante que debe considerarse, así como el periodo durante el cual el animal puede experimentar dolor, sufrimiento o angustia. Por ejemplo, en una evaluación de la seguridad en un estudio toxicológico, dependiendo de la dosis, un estudio agudo puede causar grandes molestias como consecuencia de la administración de los fármacos, pero por lo general estas serán de corta duración. Por el contrario, un animal joven puede ser expuesto a un material contaminado (por ejemplo, la encefalopatía espongiiforme bovina) sin que haya efectos adversos iniciales y, debido a la larga duración del periodo de incubación, mantendrá un buen estado de salud hasta el inicio de la enfermedad clínica.

En estudios toxicológicos crónicos, los animales pueden experimentar efectos adversos menores/moderados durante muchos meses como resultado de las dosis diarias y los efectos de las sustancias que se testan.

Para el trabajo en entorno silvestre, es extremadamente relevante una cuidadosa inspección de la autorización del proyecto, ya que la clasificación de la severidad será solo de aquellos animales que se utilicen tal y como se describa en la autorización de proyecto.⁷

Cuando, de acuerdo con el Artículo 10, se hacen excepciones para permitir el uso de animales silvestres capturados de la naturaleza, **es muy importante comprobar si la captura**

en la naturaleza se considera como parte del procedimiento científico y por lo tanto la información sobre la severidad de esta acción deberá incluirse. **En el caso de que la captura y transporte no sean parte del proyecto** (por ejemplo, cien peces capturados y transportados a un laboratorio en el que serán asignados a una serie de proyectos, durante un periodo de tiempo, y dos peces mueren durante el proceso de captura, debido a heridas por las redes) **no deberá informarse de dicha severidad, ya que ni la captura ni el transporte son un componente esencial del objetivo científico.**

No obstante, si “tomar animales de la naturaleza” es uno de los objetivos científicos (por ejemplo, el efecto de la captura y transporte en el comportamiento de los animales) la severidad observada tiene que tenerse en cuenta a la hora de informar de la severidad real.

Está de más mencionar que debe asegurarse el adecuado bienestar determinado por la Directiva durante la captura y transporte: la captura sólo se llevará a cabo por personas competentes, usando métodos que no causen más dolor, sufrimiento, angustia o daños duraderos que los inevitables; los animales deberán ser transportados en las condiciones necesarias, utilizando los métodos de contención apropiados; cualquier animal que se encuentre herido o en mal estado de salud deberá ser examinado por un veterinario u otra persona competente y las medidas necesarias para minimizar su sufrimiento deberán ser puestas en marcha. Se deberán tomar consideraciones especiales y medidas apropiadas para la aclimatación, cuarentena, alojamiento y cuidado de los animales tomados de la naturaleza y, según proceda, tomar medidas para su puesta en libertad al término de los procedimientos.

(iv) ¿Qué intervenciones pueden incluirse para reducir el impacto en los animales?

¿Cómo puede minimizarse el sufrimiento? ¿Cómo se incorporan los principios de las Tres Erres al procedimiento/proyecto?

- Planificando cómo minimizar las alteraciones en el alojamiento, cría y cuidados.
- Desarrollando procesos para la aclimatación e implementando programas de entrenamiento adecuados.
- Considerando las dosis y los procedimientos de toma de muestras para minimizar el impacto en los animales, por ejemplo, la administración mediante mini-bombas podría reducir los efectos adversos para el bienestar, en comparación con la administración de varias dosis diarias que puede requerir inmovilización que cause estrés y aclimatación a la manipulación. Sin embargo, también debe considerarse que se requiere cirugía y que los implantes son de un tamaño considerable, lo que puede tener un impacto en la locomoción y/o comportamiento.
- Las intervenciones quirúrgicas deben estar acompañadas de cuidado perioperatorio efectivo y de analgesia pre y posoperatoria.
- Mientras se planifican los procedimientos, debe considerarse el desarrollo de sistemas de seguimiento/registro del bienestar y la identificación de los probables efectos clínicos para determinar el punto final (en concordancia con los objetivos científicos).

Cada elemento de un procedimiento debería garantizar que se han abordado adecuadamente las Tres Erres. Estos aspectos deben tenerse en cuenta en primer lugar por el solicitante del proyecto, que debe informarse con el personal veterinario y de los cuidados y el OEBA, antes de que se determinen los detalles del procedimiento y asignar la severidad a la solicitud.

Consultar con anticipación a todo el personal implicado garantizará que se elabore el mejor procedimiento posible.

Estas conversaciones deberán continuar durante todo el procedimiento para asegurar que se aprovecha cualquier oportunidad para seguir desarrollando y aplicando el refinamiento en la medida que es posible, como, por ejemplo, a través de nuevas publicaciones.

Evaluación retrospectiva y evaluación de la severidad “real”

Como se ha indicado con anterioridad, existen una serie de requisitos en la Directiva para la evaluación de la severidad real experimentada por cada uno de los animales y, para ciertos proyectos, se requiere además que se lleve a cabo una evaluación retrospectiva (Artículo 39). La evaluación de la severidad real es necesaria por una serie de razones:

- Para proporcionar información para las estadísticas anuales de utilización de animales;
- Para permitir la consideración de reutilización de los animales;
- Para contribuir a la evaluación retrospectiva de los proyectos (cuando sea requerida).

La evaluación retrospectiva, además de considerar la severidad real experimentada por los animales, también requiere considerar si los objetivos del proyecto se han cumplido o no, y si se han identificado otras oportunidades para implementar las 3Rs. Todos los proyectos que utilicen primates no humanos y todos los que incluyan procedimientos “severos” **tienen** que llevar a cabo evaluación retrospectiva.

La evaluación retrospectiva puede requerirse también en otros proyectos. Estos serán determinados por la autoridad competente durante la evaluación del proyecto y el solicitante será informado de dónde y cuándo se requiere la evaluación retrospectiva.

Para poder determinar la severidad “real” se necesita desarrollar sistemas de registro y evaluación adaptados a cada proyecto, que recogerán toda la información necesaria en un formato que facilite la subsiguiente evaluación y clasificación de la severidad real.

Desarrollo de un sistema para el seguimiento y evaluación del bienestar

Existen numerosas publicaciones que ofrecen pautas para la evaluación del bienestar de los animales que estén siendo sometidos a procedimientos científicos (véanse las referencias más abajo). El grupo de trabajo recomienda en particular tres artículos sobre la creación y uso de formularios de seguimiento y evaluación. En concreto los artículos de Morton, Buchanan-Smith y el informe del grupo de trabajo conjunto sobre mejora de BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW.¹²⁻¹⁴ Estos artículos no sólo proporcionan una formación sobre este tema, sino que también debaten sobre los beneficios de emplear formularios para los animales de experimentación, para el personal en cargo de los cuidados y para la ciencia del proyecto.

Otras referencias de utilidad son “Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits, the Rabbit Grimace Scale” un método para la evaluación de dolor en conejos y una publicación de FELASA de 1994 dando unas pautas sobre dolor y sufrimiento y sobre los signos clínicos en roedores y lagomorfos, equivalentes a la clasificación de la severidad.¹⁵⁻¹⁷

Un sistema de evaluación ideal incluiría medidas simples y objetivas que pudieran aplicarse de forma consistente y ser utilizadas para detectar el dolor, sufrimiento y angustia de los animales desde el principio monitorizando su desarrollo a lo largo de los procedimientos científicos. Desafortunadamente, no se dispone de este sistema, ni es probable que siempre sea así, debido a la amplia variación en las respuestas de comportamiento entre las diferentes especies, cepas y los individuos y las características de los procedimientos y comportamientos.

El uso de sistemas de evaluación diseñados a medida para un proyecto específico y un personal formado y experimentado, pueden contribuir a mejorar significativamente los modelos animales. Por ello, es importante listar las respuestas clínicas o de comportamiento

posibles y/u observadas, que a su vez deberían evaluarse, cuantificarse o puntuarse, para permitir identificar el momento de punto final. Por ejemplo, en algunos estudios de infección, la monitorización de la temperatura se ha utilizado con éxito para identificar el punto final temprano anterior a la manifestación clínica de la enfermedad, sin por ello impedir que se alcanzasen los objetivos científicos del estudio.¹⁸

Para desarrollar un sistema de seguimiento y evaluación adecuados deberían considerarse los siguientes aspectos:

- Debe referirse al individuo y no al grupo de animales, aunque esto pueda suponer un gran reto en grupos muy grandes (por ejemplo, en algunos estudios con peces).
- Debe informarse del nivel de severidad experimentado por cada uno de los animales, usando las categorías de leve, moderada, o severa.
- Debe tenerse en cuenta la carga administrativa en el diseño del sistema para registro.
- El sistema debe, siempre que sea posible, usar medidas objetivas para evaluar el nivel de dolor, sufrimiento o angustia experimentados por el animal durante el procedimiento.
- El sistema debe requerir una definición y descripción del momento de punto final.
- El seguimiento debe recoger (a) cualquier situación relacionada con el bienestar, tanto sea esperada como inesperada, que tenga lugar durante el curso del proyecto, (b) cualquier acción de refinamiento tomada durante el curso del proyecto.
- Deben incluirse los criterios de evaluación para facilitar la clasificación de la severidad. Muchos de los sistemas publicados abogan por una forma de sistema numérico de puntuación y ordenan los signos clínicos con respecto a la clasificación de severidad. Evidentemente, la experiencia y el juicio profesional permitirán una puntuación más objetiva.
- Es esencial que el registro se haga de forma estandarizada. Sabiendo que todo sistema de puntuación contiene criterios hasta cierto punto subjetivos, la información registrada debería ser específica para el modelo animal y la especie utilizada.

Desarrollo de un sistema de registro adecuado

- Desarrollar un formulario de evaluación del bienestar a la medida del proyecto de investigación, mediante el debate con los investigadores, el personal encargado de los cuidados, y los veterinarios (o expertos debidamente cualificados, según proceda).
- Donde proceda, puntuar los signos de malestar en una escala apropiada que vaya desde normal (puntuación = 0) al nivel más alto de severidad. Utilícese puntuación objetiva siempre que sea posible.
- Identificar criterios de intervención, como por ejemplo determinando signos que requieran control/intervención veterinaria.
- Definir el límite de severidad permisible o aceptable, como por ejemplo una puntuación máxima de la suma total de los signos clínicos o de comportamiento, que no deberá excederse durante los procedimientos. Esta puntuación puede utilizarse como puntuación para establecer el momento de punto final.
- Considerar la evaluación del sufrimiento acumulado y los criterios para la posible reutilización de los animales.
- El formato electrónico puede facilitar el registro de datos, permitiendo la modificación de la información en cualquier momento para permitir el registro de situaciones inesperadas y cualquier tipo de nueva situación que tenga lugar durante el proyecto. También hace posible compartir la información con todos los implicados (técnicos, investigadores, veterinarios, OEBA, etc.).
- El formulario de evaluación debe ser sencillo y fácil de cumplimentar, tanto por observadores experimentados, como por los no experimentados y principiantes, y debe

emplear la terminología que se haya acordado (por ejemplo, el glosario de signos clínicos de FELASA).¹⁹ El formulario de evaluación deberá estar estructurado de tal forma que puedan registrarse los resultados de diferentes momentos de observación de los animales, tanto durante la manipulación, desde cerca o a distancia.

- El formulario de evaluación debería estructurarse de tal forma que pueda modificarse fácilmente en caso de que la situación, el tipo de proyecto, o la especie animal cambien
- El formulario de evaluación deberá, cuando así se requiera, permitir el registro del momento del proyecto en el que se lleve a cabo cada uno de los procedimientos, técnicas, o se aplique el refinamiento.
- El formulario de evaluación debería poder utilizarse durante todo el proyecto. Los registros de estas evaluaciones serán de utilidad para la subsiguiente revisión del proyecto y para adecuar las mejoras a futuros proyectos.

Evaluación de la severidad real

El sufrimiento total o acumulado de un animal se puede estimar a partir de la naturaleza y el número de efectos adversos e inesperados que hayan aparecido en el curso de un procedimiento. El nivel de severidad experimentada por cada uno de los animales en el curso de un procedimiento está influenciado por varios factores, cada uno de los cuales debería ser incorporado.

La siguiente lista, no exhaustiva, nos indica factores que pueden influenciar en la cantidad y nivel de sufrimiento que un animal puede experimentar durante un procedimiento científico y deben tenerse en cuenta a la hora de determinar el sufrimiento acumulado de un animal:

- La duración del proyecto/procedimiento;
- La duración de cualquier tipo de efecto adverso;
- El número de procedimientos que se llevaron a cabo en el animal;
- La frecuencia con la que se llevaron a cabo los procedimientos;
- Si el animal ha sido reutilizado para este proyecto;
- Una evaluación de la condición clínica y del bienestar del animal al final del procedimiento, que debería incluir los factores que influyeron en el peso y la condición corporales;
- Una evaluación del impacto en el comportamiento o bienestar fisiológico del animal, por ejemplo, la incidencia de comportamientos anormales, estereotípicos o agresivos.

Los siguientes factores también podrían tenerse en consideración para la evaluación de la severidad real:

- Cómo se había preparado al animal (por ejemplo, adaptación, entrenamiento);
- El número de intervenciones (quirúrgicas);
- Las vías, volúmenes y frecuencias de administración de compuestos y fármacos;
- Las características físicas y químicas de la solución o compuesto administrados, por ejemplo, si las inyecciones reiteradas o la inyección de sustancias ácidas o básicas produjeron irritación local y necrosis;
- Las vías, frecuencia y volúmenes extraídos durante la toma de muestras de sangre;
- El método y frecuencia de las inmovilizaciones;
- Los cambios en la estructura social/separación y alojamiento individualizado (aislamiento) de animales sociales.

Aunque cada uno de los elementos tiene el potencial de impactar en la severidad, la severidad real experimentada estará en gran medida determinada por la efectividad de las

medidas que se hayan tomado para reducir los efectos negativos del procedimiento, como, por ejemplo, el uso de analgésicos para reducir el dolor posoperatorio.

La determinación de la severidad real requiere una revisión de la aplicación y consecuencias de los procedimientos aplicados y de la efectividad de las acciones que se hayan tomado para minimizar el sufrimiento. La severidad real puede determinarse solamente tras una revisión de todos los efectos en el animal a lo largo del procedimiento, lo que requiere que se mantengan y consideren unos registros clínicos enfocados a este fin.

La severidad real que se registrará para cada uno de los animales debe basarse en el nivel de severidad más alto experimentado durante el procedimiento y no en la severidad al haberse terminado este.

Asignar la severidad para un animal hallado muerto durante el estudio

A pesar de los esfuerzos para hacer un estrecho seguimiento de los animales, es posible que hallemos muerto un animal como consecuencia del procedimiento experimental o por otras causas no relacionadas. El documento de trabajo de la Comisión sobre el marco de evaluación de la severidad y el artículo de discusión de 2016 proporcionan algunas pautas para la asignación de severidad en estos casos.^{6,7} En ellos se observa que: “A efectos del informe estadístico, **la severidad real debe referirse primordialmente a la severidad de los procedimientos experimentales y no a posibles incidentes no relacionados**, tales como brotes de enfermedad o inundación de las jaulas” y que “la severidad real de un animal hallado muerto debe registrarse como ‘severa’ a menos que sea posible determinar que el animal no experimentó sufrimiento severo antes de su muerte. En caso de que no sea probable que la muerte fuera precedida por sufrimiento severo, la clasificación de la severidad real debe reflejar la experiencia previa a su muerte que se conozca. Debe prestarse la debida consideración a factores tales como la frecuencia en el seguimiento, uso de analgésicos, etc.”.

Todas las muertes de animales deben ser cuidadosamente revisadas por los implicados (científicos/personal encargado de los cuidados/veterinarios) lo antes posible para asegurarse que se dispone de toda la información necesaria para determinar si la muerte está relacionada con el procedimiento y para determinar un nivel apropiado de severidad a efectos del informe estadístico. “Sea cual sea la causa” deberán tomarse las medidas oportunas para que no se repita.

Cuando la severidad real experimentada excede la que se predijo prospectivamente, puede que sea necesario notificar a las autoridades y/o reconsiderar la autorización de proyecto.

En el artículo de debate de la UE de enero de 2016 pueden encontrarse pautas para la asignación de la severidad real en aquellos casos en los que los animales sean hallados muertos, y se propone un ilustrativo árbol de decisiones para ayudar a determinar la asignación de la severidad de la muerte a efectos del informe estadístico (reproducido a continuación).⁷

1. ¿Está la muerte relacionada o no relacionada con el procedimiento al que estaba siendo sometido el animal?

1.1. No relacionada

Ejemplos de muertes no relacionadas:

- Deficiencias en el equipamiento o en los controles medioambientales, por ejemplo, inundación de la jaula o mal funcionamiento del sistema de la climatización/ventilación;

- Cuidados inapropiados tales como no proporcionar una dieta adecuada (por ejemplo, no debidamente equilibrada) o contaminada (por ejemplo, por mal almacenamiento);
- Agresión entre animales que estén alojados en grupo;
- Enfermedades o infecciones no relacionadas;
- Animales de envejecimiento: La muerte de animales en estudios de larga duración debe evaluarse para **diferenciar claramente** las muertes como **resultado del procedimiento** de las muertes como **consecuencia del proceso natural de envejecimiento**. La muerte en estos estudios no debe clasificarse automáticamente como severa, y debe prestarse la debida atención al historial clínico y la condición del animal en el momento de la última observación;
- En el caso de la “cría para el establecimiento de una línea genéticamente alterada”, cuando la **alteración genética no sea considerada como causa de mortalidad** en base a la evaluación del bienestar realizada en la línea establecida, será improbable que las muertes que se produzcan durante el programa de cría se deban a la alteración genética.

La severidad real para el animal debería reflejar el nivel más alto de severidad experimentado por el animal durante el curso del procedimiento (excluyendo el nivel de severidad relacionado con la muerte).

1.2. Relacionada: siga a la pregunta 2.

2. **¿Puede tomarse una “decisión informada” acerca de los acontecimientos que condujeron a la muerte?** Factores tales como la frecuencia de la monitorización, el uso de analgésicos, etc. serán tomados en consideración.

2.1. **Sí**, por ejemplo:

- El animal no logra recuperar la consciencia totalmente en el posoperatorio, pero ha estado en un régimen apropiado de analgésicos durante todo el proceso;
- No se han registrado anomalías clínicas durante el proceso, ni anticipadamente, pero el animal es hallado muerto horas después de un examen clínico.

La severidad real por informar debe reflejar la severidad como resultado de los eventos que se supone llevaron a la muerte.

2.2. **No**

La severidad real deberá registrarse como “severa”.

Reutilización de animales y sufrimiento acumulado

La reutilización de animales en procedimientos posteriores está permitida bajo la Directiva 2010/63/EU, pero está condicionada a una serie de factores que incluyen la severidad real del procedimiento precedente, una demostración de que el estado de salud y bienestar del animal se ha recuperado por completo y que la reutilización concuerda con la opinión de los veterinarios, teniendo en cuenta toda la experiencia de por vida del animal.²⁰

Evaluar la severidad que un procedimiento científico puede causarle a un animal puede ser difícil cuando los animales son sometidos a varios procedimientos de múltiples etapas durante un periodo prolongado, en especial cuando la naturaleza de los procedimientos implica que los animales también serán sometidos a alteraciones en sus condiciones normales de alojamiento y cuidados (por ejemplo, periodos en aislamiento).

Sin embargo, esta evaluación es necesaria para permitir la reutilización, y debe tener en cuenta la experiencia durante toda la vida del animal. Esto presenta una nueva área para considerar, ya que no sólo deben tenerse en cuenta el dolor, sufrimiento y angustia directamente causados por las diferentes etapas del procedimiento, sino también debe prestarse atención al sufrimiento supeditado al entorno y cuidados a lo largo de sus vidas.

El sufrimiento acumulado o de por vida puede considerarse como la combinación de sufrimiento directo (la aplicación de procedimientos científicos) cualquier enfermedad clínica que el animal haya sufrido (que pueden estar o no relacionadas con el procedimiento, por ejemplo, enfermedades intercurrentes o heridas quirúrgicas) y el sufrimiento supeditado (alojamiento, cuidados, transporte, etc.). La duración de estas situaciones también debe ser tenida en cuenta.

Los aspectos clave que deben tenerse en cuenta al considerar la experiencia de por vida son:

- La duración de la exposición al dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero. Una duración prolongada causará con mayor probabilidad una severidad más elevada;
- La naturaleza e intensidad de los efectos en los animales;
- El intervalo entre los procedimientos – cuanto más cortos sean los intervalos, habitualmente habrá menores posibilidades de que el animal vuelva a su estado normal;
- La naturaleza de las intervenciones y acciones que se llevarán a cabo para aliviar el sufrimiento;
- La consideración de cualquier sufrimiento supeditado.

Ejemplos ilustrativos de la clasificación de severidad y su informe – Apéndice 1

Los ejemplos de trabajo adjuntos (Apéndice 1) eran los actuales durante la elaboración de este informe y son ejemplos reales de cómo pueden enfocarse la clasificación de severidad y su informe. Ellos ponen de manifiesto aspectos que afectan al bienestar y la ciencia, sugiriendo mejoras que pueden implementarse mediante la revisión crítica del diseño del estudio, y proporcionan clasificaciones de la severidad, ilustrativas y realistas. Los ejemplos también incluyen sistemas de registro que pueden usarse en los estudios para el seguimiento y evaluación de la severidad real y elementos para la evaluación retrospectiva de un proyecto.

Es un hecho que pueden existir otras posibilidades de implementar las 3Rs que hayan ido apareciendo desde que se desarrollaron estos ejemplos, y por lo tanto no deben tomarse como modelos inalterables. Cada proyecto será diferente, en especial en lo que se refiere a los objetivos científicos que pueden influenciar de forma significativa la severidad completa de un procedimiento. La intención no obstante es explicar y fomentar este acercamiento a la evaluación de la severidad por etapas. Si se aplica como se pretende, deberían alcanzarse los resultados deseados de mejorar la ciencia y el bienestar y de evaluar e informar de forma consistente sobre la severidad real.

El grupo de trabajo ha elegido modelos animales de uso frecuente en la comunidad científica y para cada uno de ellos se ha planteado las cuatro preguntas formuladas previamente: *¿Qué se le está haciendo a los animales? ¿Qué efecto tendrá en los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causarles? ¿Qué intervenciones pueden incluirse para reducir el impacto en los animales?*

Modelos incluidos en este informe

1. Control de infección: Evaluación de la protección de candidatos para la vacunación en un modelo murino de tuberculosis y screening de candidatos a nuevos fármacos.

2. Dolor neuropático: Ligadura del nervio espinal en ratas.
3. Embolia: Eficacia de un nuevo agente terapéutico en la oclusión de la arteria cerebral media en el Tití común.
4. Evaluación cardiovascular de nuevos agentes terapéuticos: Modelo telemétrico en perros.
5. Fibrilación auricular: Evaluación de nuevas sustancias antiarrítmicas en conejos.
6. Ecotoxicología: Determinación de la bioacumulación utilizando el test de flujo constante en peces.
7. Toxicología regulatoria: Evaluación de la toxicidad aguda por vía oral en ratas.
8. Farmacocinética: Determinación de la farmacocinética tras una única administración de una sustancia de prueba en perros.

Declaración de conflicto de intereses

El/los autor(es) declararon que no existen potenciales conflictos de interés en lo que se refiere a las investigaciones, autoría, y/o publicación de este artículo.

Financiación

El autor(es) declararon haber recibido financiación para la publicación de este artículo, de la siguiente fuente: La publicación de nuestro trabajo fue respaldada por una beca de Laboratory Animals Limited.

Agradecimientos

Los autores querrían agradecerle a Laszio Dezsi su asistencia técnica con el modelo de ligadura del nervio espinal y a Pascale van Loo por su asistencia técnica con el modelo farmacocinético.

Referencias

1. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off J Eur Union 2010; L276: 33–79.
2. European Commission. Implementing decision of 20 December 2013 correcting Annex II to implementing Decision 2012/707/EU establishing a common format for the submission of the information pursuant to Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (2014/11/EU). Off J Eur Union 2014; L10: 18.
3. Rülcke T, Montagutelli X, Pintado B, et al. Guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents: FELASA Working Group Report. Lab Anim 2009; 41: 301–311.
4. Voipio HM, Baneux P, Gomez de Segura IA, et al. Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. Lab Anim 2008; 42: 1–11.
5. European Commission. Examples to illustrate the process of severity classification, day-to-day assessment and actual severity assessment, http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/examples.pdf (2013, accessed 14 May 2017).
6. National Competent Authorities for the Implementation of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Working document on a severity assessment framework, http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Endorsed_Severity_Assessmen.pdf (2012, accessed 14 May 2017).

7. Bioscience for the Future Research Council. Discussion paper for the purposes of promoting consistent reporting of statistical data (actual severity and animal numbers) under Article 54(2) of Directive 2010/63/EU and Commission Implementing Decision 2012/707/EU, <http://www.bbsrc.ac.uk/documents/1601-discussion-paperreporting-statistical-data-pdf> 2016, accessed 14 May 2017).
8. Fenwick N, Ormandy E, Gauthier C, et al. Classifying the severity of scientific animal use: a review of international systems. *Anim Welf* 2011; 20: 281–301.
9. Russell WMS and Burch RL. Principles of humane experimental technique, Special ed. Wheathampstead, UK: UFAW, 1992.
10. Smith JA, van den Broek FA, Martorell JC, et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: FELASA Working Group on Ethical Evaluation of Animal Experiments. *Lab Anim* 2007; 41: 143–160.
11. FELASA. Standardization of enrichment 2006, http://www.felasa.eu/media/uploads/WG_Enrichment_2006_Report-Final.pdf (2016, accessed 14 May 2017).
12. Morton DB. A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J* 2000; 41: 80–86.
13. Buchanan-Smith HM, Rennie AE, Vitale A, et al. Harmonising the definition of refinement. *Anim Welf* 2005; 14: 379–384.
14. Hawkins P, Morton DB, Burman O, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 2011; 45: 1–13.
15. American College of Laboratory Animal Medicine. Guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits, https://www.aclam.org/Content/files/files/Public/Active/position_pain-rodent-rabbit.pdf (2006, accessed 14 May 2017).
16. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. The Rabbit Grimace Scale – a new method for pain assessment in rabbits, <https://www.nc3rs.org.uk/news/rabbit-grimacescale-%E2%80%93-new-method-pain-assessment-rabbits> (2012, accessed 14 May 2017).
17. Baumans V, Brain PF, Brugère H, et al. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs: report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. *Lab Anim* 1994; 28: 97–112.
18. Becker MJ and De Marie S. Clinical signs predicting imminent death in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis. In: Hendriksen FM and Morton DB (eds) *Humane endpoints in animal experiments for biomedical research*. Zeist, The Netherlands: The Royal Society of Medicine Press, 1998, pp.127–132.
19. Fentener van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, et al. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab Anim* 2015; 49: 267–283.
20. Garrod K, Ryder K and Anderson D. Cumulative suffering, how can it be assessed. In: 7th World congresses on alternatives & animal use in the life sciences, Rome, Italy, 30 August–3 September 2009, ID ABS: 282.

Apéndice 1: Ejemplos ilustrativos de clasificación de la severidad y su informe

Control de infección – modelos murinos de tuberculosis

Contexto general. En 2010 se identificaron 8,8 millones de casos de tuberculosis, y aproximadamente de 1,2 a 1,5 millones de personas murieron en ese año debido a la enfermedad, convirtiéndola en la segunda mayor causa de muertes relacionadas con infección en el mundo, por detrás del VIH/SIDA.¹ A pesar de que existen algunos fármacos efectivos para el tratamiento de la tuberculosis en humanos, por el momento existen algunos retos difíciles en la lucha contra esta infección, que incluyen el riesgo de co-infección con VIH, la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos, problemas con la cumplimentación de los requerimientos de los regímenes farmacológicos de larga duración actuales, y la necesidad de reemplazar con nuevas vacunas a la vacuna clásica Bacilo Calmette-Guérin (BCG) cuya eficacia, se ha demostrado, varía entre el 0 y el 80%.¹⁻⁴ Esto hace que los modelos murinos de tuberculosis en fase pre-clínica sean más importantes que nunca.^{5,6}

La infección experimental de ratones con *M. tuberculosis* se ha utilizado para modelar la tuberculosis humana desde los primeros trabajos de Robert Koch, y desde entonces estos modelos han sido de vital importancia para comprender la interacción huésped-patógeno y para ensayar formas de terapia y prevención de esta enfermedad.^{5,7-10}

Existen marcadas diferencias en la susceptibilidad a la infección por tuberculosis en diferentes cepas de ratón. Sin embargo, y al contrario de lo que sucede en la mayoría de los humanos, no existe ninguna cepa de ratón capaz de controlar la enfermedad en una forma totalmente latente, y todos los animales terminan por sucumbir a la infección como resultado del progreso de la enfermedad, si esta no se trata.¹¹ En todas las cepas la infección experimental es rápidamente seguida de un crecimiento acentuado y exponencial del número de bacterias en los pulmones. Las cepas más resistentes (por ejemplo, la C57BL/6) son capaces de llegar a una respuesta inmunitaria específica después de esta primera respuesta, siendo por ello capaces de controlar la enfermedad hasta un estado crónico unas 3-4 semanas después de la infección. Durante esta fase el número de bacterias en los pulmones se mantiene elevado, pero relativamente estable, durante varios meses e incluso hasta más de un año (aunque permanece la patología del pulmón) y los animales en apariencia no presentan síntomas. Finalmente, la enfermedad se recrudece, aumentando su severidad hasta la muerte^{1,12} en caso de no evitarse mediante por un punto final humanitario.¹³ En cuanto a las cepas más susceptibles, o bien no son capaces de inhibir el aumento de bacterias en los pulmones tras la infección primaria, o no pueden contenerlo, lo que hace que la enfermedad progrese con rapidez y abiertamente sintomática, culminando en una muerte temprana.^{14,15} Además de la cepa de ratón, existen otros parámetros que afectan a la resistencia a la infección, tales como el tamaño del inóculo (en UFCs) y la vía de infección elegida.^{11,16,17} Dependiendo de esta serie de parámetros, la media de tiempo de supervivencia de los ratones infectados con *M. tuberculosis* puede variar entre menos de 20 días a más de 300 días.^{11,18} A continuación, se describen dos procedimientos diferentes, uno para testar vacunas y otro para la selección de nuevos fármacos experimentales.

Procedimiento ilustrativo (1) – evaluación de la protección de vacunas experimentales en un modelo murino de infección por tuberculosis

Diseño del estudio. El objetivo es encontrar vacunas experimentales que puedan reducir las UFC pulmonares en al menos 1,5 unidades logarítmicas por debajo de lo que logra la vacuna BCG. Se ha establecido un estudio piloto que con una desviación estándar de 1,2 unidades logarítmicas logra un efecto de tamaño cercano al 1,65. Para un alfa = 0,01 y una potencia del 90%, se requiere un mínimo de once animales para detectar esta diferencia de media entre la BCG y la protección de otro antígeno. Se utilizará un grupo de doce animales por si hubiera

muerres inesperadas. Se utilizarán diez grupos, cada uno de doce ratones BALB/c hembra, para probar las vacunas experimentales contra una infección de *M. tuberculosis*. Cada uno de los ocho grupos de prueba serán inmunizados mediante inyección intramuscular (en tres ocasiones a intervalos de dos semanas) con una vacuna experimental; un grupo de control será inyectado sólo con vehículo y otro grupo de control con la vacuna BCG como modelo de referencia (control “gold-standard”). Treinta días después de la última inmunización, todos los ratones serán infectados por aerosol con una dosis baja de *M. tuberculosis*. Tres ratones de cada grupo serán sacrificados, uno, dos, y tres meses después de la infección para evaluar la carga bacteriana en los pulmones y el bazo. Los ratones restantes serán monitorizados usando un sistema de puntuación clínica adaptado para su uso en estudios de infección,¹⁹ con el objeto de determinar el momento de punto final. Los ratones serán alojados en grupos en jaulas de suelo continuo con material para hacer nidos y tubos de cartón. Tendrán alimento y agua *ad libitum*. Todos los animales serán sacrificados mediante sobredosis de anestésico con pentobarbital de sodio.

Consideración de refinamientos específicos y del punto final humanitario

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?	¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?	
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto final
Inmunización intramuscular Inyección de antígenos de la vacuna experimental con adyuvante en ambas patas traseras.	La inyección puede ser dolorosa y/o causar trauma mecánico y potencialmente daño nervioso. La reacción inmunitaria puede causar inflamación dolorosa. Un trauma previo causado por la técnica de inoculación de este antígeno puede aumentar el dolor experimentado en las subsiguientes inmunizaciones.	Personal bien entrenado. Seguimiento de las guías recomendadas para la administración de sustancias. Monitorizar estrechamente a los animales tras cada inoculación del antígeno.	Los animales que muestren cojera permanente y/o presenten signos de angustia no transitoria relacionadas con lesiones por la inyección serán sacrificados.
Infección por aerosol 30 días después de la última inmunización, se agruparán los ratones Balb/c en una cámara, de generación de aerosol. El equipo está calibrado para descargar una dosis específica de bacilos viables en los pulmones de cada uno de los animales a partir de una suspensión de micobacterias.	Posible angustia leve causada por la manipulación y estar en la cámara durante un ciclo de 20 minutos. La infección primaria normalmente es asintomática. No obstante, algunos ratones han manifestado fiebre transitoria en esta etapa. De tres a cuatro semanas después de la infección, se espera que los animales controlen la infección	Monitorización diaria de los animales. Se utilizarán cantidades relativamente reducidas para la inoculación (~2log ₁₀ UFC) para evitar una reacción inmunitaria exacerbada y una carga bacteriana excesiva durante el estado crónico. No se esperan efectos particularmente adversos durante la infección primaria. Se espera que todos los animales controlen la	No se esperan efectos adversos.

	hasta un estado crónico. Durante la infección crónica, los ratones no presentan síntomas aparentes.	infección hasta un estado crónico.	
Evaluación de la protección de la vacuna	Es esperable que los momentos establecidos para recolectar la información coincidan con las fases asintomáticas o levemente sintomáticas de la enfermedad.	Estrecha monitorización de los animales durante esta etapa mediante hojas de puntuación.	Se espera que los momentos de observación antecedan a cualquier signo clínico evidente.
Determinación del tiempo de supervivencia	El recrudecimiento de la enfermedad se caracteriza por la transición de un estado crónico no clínico crónico a un estado evidentemente sintomático de severidad progresiva. Los signos asociados con la enfermedad activa incluyen dificultad respiratoria, postura encorvada, falta de acicalado; incapacidad para comer y beber, fiebre y caquexia. Si no se evitan mediante un punto final temprano, los síntomas de severidad progresan hasta alcanzar un estado hipocinético sin respuesta ("moribundo"), culminando con la muerte.	Estrecha monitorización de los animales y control diario del peso para determinar el paso de enfermedad crónica sub-clínica a la enfermedad evidente, momento en el que será necesario el punto final.	Si por cualquier motivo los animales alcanzan una puntuación clínica predefinida, serán sacrificados. Punto final establecido mediante puntuación clínica. Aparte de esta puntuación, los animales que pierdan más del 15% de su peso (comparado con su peso máximo alcanzado) serán sacrificados.

Evaluación inicial prospectiva. Aunque la carga bacteriana y los parámetros inmunológicos se usan como indicadores de la protección de la vacuna (véase la evaluación provisional) el índice de supervivencia proporciona información importante y normalmente se usa en este tipo de estudio.

Se utilizarán criterios objetivos, como los de las hojas de puntuación, para implementar el punto final y evitar que los animales alcancen estados avanzados de enfermedad. No obstante, existe el riesgo de que algunos animales alcancen de forma imprevista niveles significativos de sufrimiento y angustia como resultado de la infección experimental (en especial los controles con vehículo) así como por daños nerviosos accidentales o una respuesta inmunológica exacerbada, presentando inflamación por la inoculación del antígeno (tres inyecciones intramusculares en el muslo)^{20,21}. Por ello es apropiado asignarle la categoría de severidad prospectiva como **MODERADA**.

¿Podría la categoría ser **SEVERA**?

No, si las medidas de refinamiento propuestas se aplican de forma apropiada. En particular el uso de las hojas de puntuación puede ser de gran ayuda a la hora de identificar signos tempranos de la actividad de la enfermedad, y de esta forma identificar los momentos tempranos de punto final, evitando a los animales un sufrimiento significativo.

¿Podría la categoría ser **LEVE**?

Dependiendo del momento de la eutanasia, los animales podrían no dar aún muestras del inicio de la enfermedad, y, por lo tanto, la clasificación sería LEVE.

Para los estudios de supervivencia, en los casos donde la vacuna control haya sido efectiva y se haya maximizado el refinamiento, existe la posibilidad de que estos animales sólo muestren signos clínicos LEVES. Sin embargo, ya que en ratones incluso la vacunación BCG sólo logra reducir la carga bacteriana (ver introducción) y por tanto todos pierden control de la infección, una clasificación de severidad LEVE resulta poco probable.

[Tabla 2]

Observación clínica/Sistema de puntuación. Los animales fueron monitorizados estrechamente desde el momento de la infección experimental. Al final de esta sección se incluye un ejemplo de sistema combinado de observación y puntuación, utilizados para monitorizar la condición clínica de los animales a lo largo del procedimiento.

A excepción de un animal al que tuvo que practicársele la eutanasia y retirarse del estudio por mostrar una cojera pronunciada en una pata trasera después de la segunda inmunización, todos los animales se recuperaron del programa de inmunización sin complicaciones inesperadas. No se asociaron complicaciones a la infección con aerosoles.

Ninguno de los ratones que fueron sacrificados en los momentos preestablecidos (tres de cada grupo, en tres momentos diferentes) mostraba signos aparentes de enfermedad.

De los ocho grupos vacunados, cinco de esos grupos mostraron una carga bacteriana más baja en todos los órganos analizados, un inicio tardío de la enfermedad y un tiempo de supervivencia significativamente más largo que los grupos no vacunados. Dos grupos vacunados mostraron niveles de protección similares a los del grupo de vacuna BCG y en el grupo restante, la patología era similar a la del grupo de control, que fue el primero en dar muestras de enfermedad recurrente. Estos animales fueron sacrificados a su debido tiempo de acuerdo con la puntuación previamente establecida. No se registraron pérdidas inesperadas de animales, por ejemplo, por muerte espontánea.

Se consideró que 89 animales (que fueron sacrificados en los momentos preestablecidos, excepto el que cojeaba) habían experimentado una severidad LEVE.

Se consideró que 31 animales (30 usados en los estudios de supervivencia y uno sacrificado por la cojera) habían experimentado una severidad MODERADA.

Ejemplo de observación clínica/sistema de puntuación

Vocalización	No vocalización	0
	Vocalización provocada por la manipulación	1
	Vocalización no provocada, causada por el dolor	2
Actividad	Interacción con los compañeros de jaula, movimiento y comportamiento característicos de la especie, muestra curiosidad, patrones normales de comportamiento provocado (por ejemplo, reacción de escape al acercarnos)	0
	Interrupción de la actividad, patrones de comportamiento deprimidos, incluso aunque se le provoque, consumo reducido de alimento y agua	1
	No responde, letárgico, no consume alimento ni agua	2
Condición del pelaje	Pelaje brillante y ajustado al cuerpo del animal	0
	Pelaje brillante, piloerección parcial	1
	Pelaje sin lustro, marcada piloerección	2
Deshidratación	Turgencia normal de la piel	0
	Turgencia reducida (se mantienen los pliegues cutáneos)	1
Flujo (óculo-nasal)	Sin flujo	0

	Flujo óculo-nasal, secreción serosa	1
	Flujo óculo-nasal, secreción copiosa y supurativa	2
Acicalamiento	Acicalamiento normal	0
	Acicalamiento reducido, área anal manchada con heces	1
Locomoción	Sin acicalamiento, área anal manchada con heces secas, impactación fecal	2
	Locomoción espontánea sin ser provocada, o mientras duerme al abrirle la jaula y provocarle	0
	Locomoción tras provocación, andar tambaleante y trabajoso	1
Postura	Ninguna locomoción	2
	Normal	0
	Intermitentemente encorvada	1
Respiración	Permanentemente encorvada, parcialmente en posición lateral (el ratón anda de lado)	2
	Normal	0
	Taquipnea o patrón respiratorio anormal	1
	Taquipnea, respiración dificultosa, patrón de respiración anormal, desvanecimientos ocasionales	2
Otro		

La suma total de 10 puntos determina el momento de punto final en el que los animales serán eutanasiados.

Procedimiento ilustrativo (2) – selección de nuevos fármacos experimentales en un modelo murino de infección por tuberculosis

Diseño del estudio. El objetivo es encontrar fármacos equiparables a los antibióticos efectivos actuales, que permitan a los animales sobrevivir hasta seis meses después de la infección sin recaídas. En ese periodo, hemos observado un porcentaje de supervivencia del 20% en los controles sin tratar. Para detectar esta diferencia de supervivencia, con una potencia del 90% y $\alpha = 0,05$, tan sólo se necesitan seis animales (prueba exacta de Fisher). No obstante, para paliar pérdidas imprevistas, se utilizarán ocho animales por grupo. Se utilizarán trece grupos de $n=8$ ratones hembra C3H/HeJ para comparar la eficiencia de cuatro nuevos fármacos experimentales contra una infección de *M. tuberculosis* con otros productos ya con licencia. Todos los animales serán infectados por vía intratraqueal (3 unidades logarítmicas de UFC en 100 μ l de tampón fosfato salino, es una dosis que se dictaminó apropiada durante la evaluación preliminar) mediante incisión en la tráquea. Cuatro semanas después de la infección, se administrará mediante sonda oral a cuatro grupos de ratones, una dosis baja del compuesto a testar que se les haya asignado, una vez al día, cinco días por semana y durante dos semanas. Cuatro grupos recibirán dosis altas del compuesto de prueba. A un grupo de control se le administrará sólo vehículo, mientras que los otros cuatro grupos recibirán uno u otro de los dos fármacos que actualmente se utilizan como criterio de referencia (“gold-standard”) (CR-A, CR-B; controles positivos) en dos dosis para cada fármaco. Se registrará la supervivencia de todos los grupos de ratones. Se utilizará una valoración por puntuación clínica para determinar el momento del punto final. Los ratones serán alojados en jaulas de suelo continuo con material para construir nidos y tubos de cartón. Los animales tendrán acceso a agua y comida *ad libitum*. Todos los animales que sobrevivan serán sometidos a la eutanasia mediante sobredosis anestésica con pentobarbital de sodio al término del experimento (14 días después de recibir la dosis).

Consideración de refinamientos específicos y del punto final humanitario

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?	¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?
--	--	---

	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto final
<p>Instilación intratraqueal Los ratones serán infectados a través de una incisión en la tráquea bajo anestesia general, inducida por inyección intravenosa de ketamina/medetomidina.</p>	<p>Efectos adversos de la anestesia general. Complicaciones postquirúrgicas, dolor en el lugar de la herida; reapertura de la herida, infección. La herida suele curarse en 2-3 días.</p>	<p>Anestesia y analgesia adecuadas, de acuerdo con los efectos adversos conocidos durante la inducción y recuperación. Técnica aséptica, manta de calor durante la anestesia. Control no farmacológico del dolor y el sufrimiento. Observación diaria. Personal bien formado.</p>	<p>Complicaciones postquirúrgicas como punto final definido.</p>
<p>Administración de fármacos Administración oral diaria de los fármacos experimentales mediante sonda, durante una semana, empezando una semana después de la infección.</p>	<p>Introducir una sonda oral es un procedimiento difícil que puede causar aspiración de fluidos por los pulmones, perforación del esófago o pared gástrica, irritación, inflamación y úlcera del esófago como consecuencia de repetir las dosis. Falta de apetito y pérdida de peso causados por el estrés relacionado con la introducción de la sonda, o efectos secundarios del fármaco.</p>	<p>Se ensayarán formas de mejora para el sondaje oral en un estudio piloto, que consistirá en aplicar una capa de sacarosa a una sonda, método que ha demostrado anteriormente su eficacia para apaciguar a los ratones e inducirles a tragar, reduciendo el estrés relacionado con el procedimiento. Personal bien formado.</p>	<p>Cualquier animal que presenten signos de lesiones relacionadas con el sondaje, serán eutanasiados.</p>
<p>Progreso de la enfermedad y evaluación del tiempo de supervivencia Se monitorizará a los ratones en busca de signos de recrudescimiento de la enfermedad. El punto final se determinará mediante valoración/puntuación clínica. Se llevará a cabo un análisis <i>post mortem</i> para obtener más información.</p>	<p>Los signos asociados con la enfermedad activa incluyen dificultad respiratoria, postura encorvada, falta de acicalamiento; incapacidad para comer y beber, fiebre y caquexia. Si no se mitigan, los síntomas de severidad progresan hasta alcanzar un estado hipocinético sin respuesta ("moribundo"), culminando con la muerte.</p>	<p>Se monitorizarán estrechamente y se les asignará una puntuación clínica, mediante el uso de una hoja de puntuación. Para estudios de supervivencia, se utilizará una puntuación clínica preestablecida para determinar el momento de punto final.</p>	<p>Punto final establecido por una puntuación clínica. Sin importar dicha puntuación, los animales que pierdan más del 15% de su peso (comparado con el peso máximo alcanzado) serán sacrificados. Los animales que muestren signos de angustia severa, determinado por la puntuación de su condición corporal, serán sacrificados.</p>

Evaluación inicial prospectiva. El uso de la instilación intratraqueal genera problemas para el bienestar en comparación con otras vías, ya que requiere anestesia general y, además de la angustia relacionada con la recuperación, puede generar otras complicaciones antes de que las heridas terminen de cicatrizar.²³ Sin embargo, permite una inoculación precisa, estandarizada y exitosa. Un procedimiento quirúrgico optimizado tendrá como objetivo evitar complicaciones posteriores a la intervención y reducir la variabilidad.

A pesar de que se requiere evaluar la supervivencia, se reemplazará la muerte por punto final humanitario basándose en parámetros clínicos objetivos y fácilmente medibles. No obstante,

como los ratones C3H no pueden establecer a largo plazo el control de la infección de *M. tuberculosis*, existe la posibilidad de que al menos algunos animales alcancen un estado avanzado de enfermedad, en el momento en que se inicie el tratamiento (en especial los grupos de control con vehículo) o como resultado de una baja eficacia del tratamiento. Por lo tanto, la clasificación de severidad prospectiva asignada será **SEVERA**.

¿Podría la clasificación de severidad ser **MODERADA**?

Cuando el progreso de la enfermedad se interrumpe mediante tratamiento con fármacos en los grupos de referencia (*gold-standard*) y posiblemente también en los grupos tratados con los compuestos de prueba, podría retrospectivamente determinarse que los animales no han excedido la categoría **MODERADA**.

¿Podría la clasificación de severidad ser **LEVE**?

No, toda intervención quirúrgica practicada bajo anestesia general se define como MODERADA.

Observación clínica/Sistema de puntuación. Los animales son monitorizados estrechamente; se les proporciona analgesia y tratamiento de apoyo suplementario en caso necesario.

El método combinado de observación clínica y sistema de puntuación usado para monitorizar la condición clínica de los animales a lo largo del procedimiento es el mismo que en el ejemplo anterior.

Ejemplo de una hoja de valoración por puntuación clínica del animal en el grupo del compuesto de prueba 3 LD encontrado muerto en el día 5 (por error de sondaje).

Número de proyecto:	Número de procedimiento:						
Número de animal:							
Número de experimento:							
Fecha de inicio del procedimiento: ... / ... / ...							
Signos clínicos	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Actividad (0-2)	0	0	1	2			
Condición del pelaje (0-2)	0	0	1	2			
Deshidratación (0-2)	0	0	0	2			
Descargas (0-2)	0	0	0	0			
Acicalamiento (0-2)	0	0	1	1			
Locomoción (0-3)	0	0	0	0			
Postura (0-2)	0	1	0	0			
Respiración (0-2)	0	0	0	0			
Vocalización (0-1)	0	0	0	0			
Otro					Hallado muerto		
Hora del día	10:00 am	10:00 am	10:00 am	10:00 am	10:00 am		
Iniciales del observador							

Un animal murió bajo anestesia. Todos los otros animales sobrevivieron y se recuperaron de la instilación intratraqueal sin complicaciones adicionales debidas a esta fase del procedimiento. Los controles de referencia no mostraron signos de enfermedad al final del tratamiento. El estudio piloto propuesto mostró que los animales son menos reacios a la sonda oral cuando se emplearon sondas con cobertura de azúcar. No obstante, se encontraron tres animales muertos al final del tratamiento con los fármacos (uno de los controles de referencia, dos del compuesto de prueba 3 LD) casos en los que el examen post mórtem determinó que la causa más probable de la muerte fueron lesiones provocadas por la sonda.

Dos grupos de ratones tratados con el compuesto de prueba 1 (dosis alta y baja) mostraron resultados comparables a los vehículos control, junto con un grupo con dosis baja del compuesto 3. Estos tres animales alcanzaron etapas sintomáticas de la enfermedad, pero se previno la muerte espontánea mediante una atenta monitorización para determinar el momento de punto final. Los compuestos de prueba 2 y 4 evitaron el desarrollo de la

enfermedad en los grupos de dosis tanto altas como bajas, y el compuesto 3 sólo en animales tratados con dosis altas.

Un animal murió bajo anestesia durante la inmunización inicial (del grupo de control negativo):

SIN RECUPERACIÓN

71 ratones (31 con dosis alta y baja de los controles del fármaco de referencia + 32 con dosis alta y baja del fármaco a testar y 8 con dosis alta del fármaco a testar): aunque se evitó el desarrollo de la enfermedad y no se desarrollaron signos clínicos. Debido a la intervención quirúrgica la severidad es **MODERADA**

29 ratones (7 controles negativos + 16 con dosis alta y baja de fármaco a testar y 6 dosis baja de fármaco de testar): **MODERADA**

3 incidentes relacionados con la sonda (1 animal del grupo control del fármaco de referencia, 2 del mismo grupo tratado con dosis baja): **SEVERA**

[Tabla 6]

Referencias

1. World Health Organization. *Global tuberculosis control*. Geneva, Switzerland: WHO, 2011.
2. Palomino JC, Ramos DF and da Silva PA. New antituberculosis drugs: strategies, sources and new molecules. *Curr Med Chem* 2009; 16: 1898–1904.
3. Kaufmann SHE, Hussey G and Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. *Lancet* 2010; 375: 2110–2119.
4. Koul A, Arnoult E, Lounis N, et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011; 469: 483–490.
5. Apt A and Kramnik I. Man and mouse TB: contradictions and solutions. *Tuberculosis* 2009; 89: 195–198.
6. Rylance J, Pai M, Lienhardt C, et al. Priorities for tuberculosis research: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 886–892.
7. Orme IM and Collins FM. Mouse model of tuberculosis. In: Bloom BR (ed.) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994, pp.113–134.
8. Gupta UD and Katoch VM. Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis* 2005; 85: 277–293.
9. Flynn JL. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Mic Infect* 2006; 8: 1179–1188.
10. Dharmadhikari AS and Nardell EA. What animal models teach humans about tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 503–508.
11. Medina E and North RJ. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. *Immunology* 1998; 93: 270–274.
12. Rhoades ER, Frank AA and Orme IM. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 1997; 78: 57–66.
13. Franco NH, Correia-Neves M and Olsson IA. How “humane” is your endpoint? Refining the science-driven approach for termination of animal studies of chronic infection. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002399.
14. North RJ and Jung YI. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 599–623.
15. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Ann Rev Immunol* 2009; 27: 393–422.
16. North RJ. *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. *J Infect Dis* 1995; 172: 1550–1553.
17. Chackerian AA and Behar SM. Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*: lessons from inbred strains of mice. *Tuberculosis* 2003; 83: 279–285.

18. Nikonenko BV, Averbakh MM, Apt AS, et al. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *Tuber Lung Dis* 2000; 80: 15–25.
19. Munder A and Tümmler B. Assessing pseudomonas virulence using mammalian models: acute infection model. In: (eds) *Pseudomonas methods and protocols*. The Netherlands: Springer, 2014, pp.773–791.
20. Morton DB, Jennings M, Buckwell A, et al. Refining procedures for the administration of substances. *Lab Anim* 2001; 35: 1–41.
21. Baumans V and Pekow C. Common nonsurgical techniques and procedures. In: *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume I*. 3rd ed. London: CRC Press, 2010, pp.401–445.

Dolor neuropático – ligadura del nervio espinal

Contexto general

El dolor neuropático se refiere a una serie de síndromes de dolor (dolor urente espontáneo, alodinia, hiperalgesia, post sensación, parestesia, etc.) como resultado de una lesión nerviosa inicial que causa una respuesta acrecentada y una transmisión de señal patológica en las vías del dolor del sistema nervioso. La frecuencia estimada del dolor neuropático en la población es del 1-1,5%. El mayor grupo de pacientes son aquellos con neuropatía periférica diabética (que representan el 45-70% de los pacientes diabéticos) mientras que la neuralgia post terapéutica es la segunda causa más frecuente de dolor neuropático. El sida y cáncer/quimioterapia también pueden predisponer al dolor neuropático. Las lesiones traumáticas nerviosas pueden tener como resultado un síndrome de dolor conocido como causalgia, o síndrome de dolor regional complejo II (SDRC 2), es un dolor muy persistente y está considerado como una de las formas más graves de dolor neuropático. El dolor neuropático es resistente a los medicamentos convencionales contra el dolor, y por lo tanto supone un enorme reto terapéutico. A pesar de recientes mejoras en su tratamiento mediante la introducción de nuevos fármacos, todavía son necesarios fármacos más eficaces, de acción más rápida y con menores efectos secundarios.

Un síntoma típico y difícil de tolerar del dolor neuropático es la alodinia, que se produce cuando un estímulo térmico o mecánico (por ejemplo, el contacto de la piel con la ropa) que normalmente no causa dolor se vuelve doloroso. Los fármacos con efectos antialodínicos pueden aliviar de forma considerable el sufrimiento de los pacientes neuropáticos. La lesión nerviosa experimental en animales puede inducirse mediante diferentes métodos, imitando diferentes etiologías del dolor neuropático.¹ Los animales con diabetes inducida por estreptozotocina también desarrollan neuropatía periférica dolorosa, mientras que la polineuropatía tóxica se puede modelar mediante tratamiento con fármacos citotóxicos, por ejemplo, vincristina o cisplatino. También se han desarrollado una serie de modelos basados en una lesión quirúrgica a un tronco nervioso principal (ligadura parcial o transección), que son más o menos equivalentes directos del SDRC II humano. El modelo que aquí se analiza utiliza la lesión del nervio espinal para inducir alodinia mecánica con el objeto de probar los efectos de compuestos analgésicos.² Se practica una ligadura unilateral del quinto nervio espinal lumbar (L5), y a continuación se deja que los animales se recuperen durante dos semanas. La ventaja que presenta el modelo de lesión del nervio espinal en comparación con otros modelos como el de constricción crónica o la ligadura parcial del nervio ciático es que el nivel de lesión es más uniforme y por lo tanto el desarrollo de la alodinia es más consistente. Además, el déficit motriz y las deformidades en las patas después de la lesión selectiva en L5 son menos graves. Los umbrales mecano-nociceptivos de las ratas se determinan mediante estesiómetro plantar dinámico y/o filamentos de von Frey antes y después de la intervención.³ La alodinia térmica también puede medirse con un estimulador de pata de calor radiante. Los compuestos a testar normalmente se administran en un régimen de dosis repetidas comenzando después del periodo de recuperación, cuando la alodinia ya se ha desarrollado.

Procedimiento ilustrativo

Diseño del estudio. En este ejemplo, 30 ratas Sprague-Dawley macho serán sometidas a la ligadura unilateral del nervio espinal. Después de la operación se les permitirá recuperarse durante dos semanas, periodo durante el cual se monitorizará diariamente el estado de la herida, el miembro afectado y el estado de salud general, incluyendo la medida del peso corporal y comportamiento en la jaula. En el día 14 del postoperatorio se medirán los umbrales mecano-nociceptivos para confirmar el desarrollo de la alodinia mecánica. Sólo se incluirá en los grupos de tratamiento a los animales que presenten un mínimo descenso del 20% del umbral preoperatorio según el estesiómetro dinámico plantar y un umbral de von Frey de <5,4g. Las ratas alodínicas se distribuyen al azar en tres grupos para ser tratadas por vía intraperitoneal con el compuesto de prueba A en dosis baja, alta y un grupo de control con vehículos, respectivamente. Se sigue un régimen de repetición diaria de dosis durante 8 días, y el efecto antialodínico se determina en el *día 1, día 4 y día 8* de tratamiento, 30 y 60 minutos después de la inyección. Al final del estudio los animales son sacrificados. En este estudio no se administrarán analgésicos ya que esto interferiría con los resultados.

Consideración de refinamientos específicos y del punto final humanitario

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?	¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?	
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto final
Medición de referencia del umbral mecano-nociceptivo	Estimulación táctil repetida de la pata hasta el umbral sensorial o valores límite	Utilización de filamentos de von Frey y estesiómetro dinámico plantar Uso de valores límites para la fuerza del estímulo	Se excluirá a las ratas con un umbral de referencia bajo
Intervención: Ligadura de nervio espinal L5	Posibles complicaciones durante la intervención: Potencial depresión cardio-respiratoria/paro cardio-respiratorio Daño de tejidos por la cirugía Hemorragia Daño a troncos nerviosos adyacentes	Elección de la anestesia adecuada, dosificación cuidadosa Monitorizar la temperatura y el oxígeno Práctica quirúrgica experta Refinamiento del modelo original publicado para reducir el daño a los tejidos, mediante una técnica de exploración quirúrgica alternativa que no afecte a la apófisis transversa de la vértebra	Fallo cardio-respiratorio, no recuperación de la anestesia (probabilidad muy baja siempre que se sigan buenas prácticas quirúrgicas, sólo posibilidad teórica)
Recuperación durante dos semanas	Posibles complicaciones durante la recuperación posoperatoria: Dificultades para respirar (durante la recuperación posoperatoria) Infección de las heridas Dolor y malestar Efecto de la intervención: Dolor en la pata afectada, evitando cargar su peso sobre la extremidad Deficiencia motriz en la pata afectada	Cuidados postoperatorios adecuados desde su recuperación Personal bien formado Técnicas quirúrgicas asépticas Uso de antibióticos cuando sea necesario Asegurarse de que las heridas se curen de forma apropiada Observación general del animal Medida del peso corporal Materiales blandos en la jaula, manipulación cuidadosa del animal Hay que asegurar que haya espacio suficiente para permitir que los animales descansen sin	Malas condiciones generales En caso de que las heridas se infecten, los animales serán sacrificados, ya que el tratamiento interferiría con los objetivos científicos (probabilidad muy baja) Los animales que muestren un déficit motriz considerable en la extremidad afectada, o signos de autotomía que no sean morderse las uñas, serán sacrificados (probabilidad muy baja si la

Determinación de la alodinia mecánica (también puede medirse la alodinia térmica)	Estímulo doloroso en la extremidad afectada	estar en contacto con otros animales. Usar técnicas que determinen el umbral mecano-nociceptivo en animales sin inmovilizar (por ejemplo, filamentos de von Frey, estesiómetro dinámico plantar) en lugar de aplicar estímulos supramáximos [El calor radiante se aplica para determinar el umbral nociceptivo térmico]	intervención se realiza de forma adecuada) Los animales que no lleguen a desarrollar el nivel predeterminado de alodinia después de dos semanas de recuperación son excluidos y sacrificados
Administración de compuestos de prueba o vehículo (intraperitoneal) Dosis diarias durante 8 días	Malestar transitorio relacionado con la vía de administración Posibles efectos secundarios de los fármacos de prueba	Personal competente formado para inyectar correctamente el compuesto, atendiendo a las buenas prácticas Observación clínica diaria de las ratas Elección de la dosis basada en analgesia previa y en los efectos secundarios para el comportamiento (por ejemplo, actividad locomotriz)	Eutanasia al final del procedimiento No se espera que las dosis del compuesto de prueba causen efectos adversos, pero se sacrificará a los animales en caso de notarse signos clínicos severos

Análisis prospectivo inicial. Las intervenciones que implica este modelo no exceden un nivel de severidad moderada si se consideran individualmente. Si la intervención se lleva a cabo con el conocimiento apropiado y, como consecuencia, no hay complicaciones, esta parte del procedimiento está dentro de la categoría moderada. Después de la intervención, una monitorización atenta y unos claros puntos finales asegurarán que ningún animal supere la severidad moderada.

Por ello, se considera como apropiada una clasificación prospectiva de severidad MODERADA. ¿Podría la clasificación de severidad ser LEVE?

No. Ya que las intervenciones resultan en un dolor prolongado y esto hace que el modelo sea moderado, y que la evaluación del dolor en sí es el objetivo del estudio, no es posible llevar a cabo este procedimiento dentro de la clasificación LEVE.

Observación clínica/Sistema de puntuación. Los animales se monitorizaron estrechamente desde la intervención hasta el final del procedimiento. Se aplicaron dos valoraciones nociceptivas para medir la latencia de la retirada de las patas traseras: (1) se usaron filamentos de von Frey de diferente rigidez para determinar cuál provocaba la retirada de la pata trasera; (2) estesiómetro plantar dinámico. Durante las valoraciones no se utilizó ningún otro agente.

Al final de esta sección se incluye un ejemplo de una hoja de observación y de una hoja de puntuación para monitorizar la condición clínica de los animales a lo largo del procedimiento.

Resultados y evaluación de la severidad real. Todos los animales, excepto uno en el grupo de control con el vehículo, se recuperaron de la intervención sin complicaciones inesperadas, gracias a los cuidados intensivos perioperatorios.

Las valoraciones nociceptivas indicaron que se experimentó un dolor leve o moderado.

Grupo del vehículo

1 de 10 animales no se recuperó de la intervención. SIN RECUPERACIÓN.

1 de 10 animales mostró signos de automutilación y fue sacrificado. Severidad MODERADA.

1 de 10 animales alcanzó el punto final y fue sacrificado. Severidad MODERADA.

7 de 10 animales mostraron pobres resultados en la valoración nociceptiva y en las pruebas de comportamiento en comparación con los animales tratados. Sin embargo, no mostraron ningún otro efecto clínico y mantuvieron su peso corporal. La puntuación clínica fue similar a la de los animales tratados después de la intervención. Estos animales desarrollaron déficit neurológico-locomotriz moderado y, con el tiempo, mostraron una reducción gradual de la puntuación clínica, posiblemente debida a su capacidad de compensar y adaptarse a los déficits neurológicos de larga duración. Severidad MODERADA.

Grupos de tratamiento

10/10 animales tratados con dosis bajas mostraron una leve mejoría en la función motriz, junto con una mejora en la puntuación clínica. El agente tuvo un efecto anti-alodínico, comparado con el vehículo. No se informó de ningún efecto secundario específico. Severidad MODERADA.

10/10 animales tratados con dosis más altas mostraron una mejora significativa en la función motriz, junto con una mejora en la puntuación clínica. El agente tuvo un claro efecto anti-alodínico, comparado con el vehículo. No se informó de ningún efecto secundario específico. Severidad MODERADA.

Aunque los animales en los grupos tratados experimentaron menos dolor, debido a la intervención y la prolongada alodinia, la categoría de severidad para todos los animales se consideró Moderada.

Ejemplo de observación clínica/sistema de puntuación

La severidad se evalúa usando una valoración acumulada basada en observaciones clínicas generales (peso corporal, apariencia, comportamiento, entorno de la jaula, consumo de alimento y agua, funciones corporales) y una evaluación específica para el procedimiento.

Puntuación de 0-5 más la intervención = MODERADA

Si aparecen dos puntuaciones de 3 puntos en cualquiera de las categorías o una puntuación total de 12 o superior, se procede al punto final.

Nota: ya que las complicaciones quirúrgicas se registran por lo general en el periodo de recuperación inmediatamente posterior a la operación, durante las primeras 24 horas es esencial una atenta y experta monitorización y una evaluación empática para asegurar que se identifican los efectos adversos y se toman medidas para combatirlos. Los animales son sacrificados si su sufrimiento excede el de la categoría moderada.

1 – Revisar la frecuencia de la monitorización.

4 – Proporcionar los cuidados suplementarios apropiados, por ejemplo, líquidos adicionales o papillas

Deshidratación/diarrea: lactato de Ringer o suero normal

Dilatación abdominal (ascitis): drenaje para reducir la presión

Pérdida de peso: dieta blanda

5 – Revisar el progreso con el veterinario

Si aparecen dos puntuaciones de 3 puntos en cualquiera de las categorías o una puntuación total de 12 o superior, se procede al punto final.

Signos clínicos generales	Puntuación
Apariencia	
Pérdida de peso del 5-10%	1
Pérdida de peso del 11-15%	2
Pérdida de peso del 16-20%	3
Pérdida de peso del 20% o más	Punto Final
Pelaje levemente descuidado	1
Piloerección leve	2

Piloerección marcada	3
Funciones corporales	
Respiración rápida, lenta o profunda – leve	1
Respiración rápida, lenta o profunda – moderada	2
Respiración rápida, lenta o profunda – marcada	3
Consumo de alimento y comida	
No bebe hasta el 10% de su peso corporal durante 24 horas	1
No bebe en absoluto	3
Consumo de alimento reducido	1
Anorexia	3
Comportamiento	
Movilidad levemente reducida	1
Movilidad notablemente reducida	2
Significativos problemas de movilidad	3
Inmovilidad >24 horas	Punto final
Tensión y nerviosismo al ser manejado	2
Notable angustia al ser manejado (agitación, vocalización, agresividad)	3
Indicadores específicos del procedimiento	Puntuación
Curación de la herida	
Los bordes de la herida están cerrados, sin signos de inflamación	0
Los bordes de la herida están levemente inflamados y eritematosos	1
La herida está claramente infectada/parcialmente abierta	3
La infección de la herida no mejora con el tratamiento tópico y sistémico/la herida está totalmente abierta	Punto Final
Estado del miembro operado	
Peso sobre la extremidad levemente reducido	1
Notables problemas al andar (cojera)	2
Graves problemas al andar/en algunos casos la pata se mantiene en posición elevada constantemente	3
Déficit motriz grave >24 horas sin moverse/mostrar signos de autonomía	Punto Final
TOTAL	

Referencias

1. Jaggi AS, Jain V and Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 1–28.
2. Kim SH and Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355–363.
3. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53: 55–63.

Embolia – Eficacia de un nuevo agente terapéutico en oclusión de la arteria cerebral media con filamento intraluminal en el tití común

Contexto general

La embolia o derrame cerebral se define como, *una pérdida o alteración de las funciones corporales normales como resultado de una suficiente falta de riego sanguíneo en una parte del cerebro*. A pesar de que se conoce más a fondo la fisiopatología de la lesión vascular cerebral, encontrar un tratamiento efectivo para el derrame cerebral sigue siendo una meta médica sin cumplir y la investigación continúa con el objetivo de encontrar medidas preventivas y terapéuticas adecuadas.

Existen tres tipos de derrame cerebral en humanos: isquémico, hemorrágico intracerebral y hemorrágico subaracnoideo, pero la mayoría de los modelos animales actualmente disponibles se basan en el derrame isquémico. Los modelos de derrame cerebral, por su naturaleza, representan un reto desde el punto de vista del bienestar animal. Es de vital importancia que

haya una buena comunicación e interacción entre todas las personas que participan en los procedimientos científicos (veterinarios, investigadores, técnicos y cuidadores) para asegurar que exista un equilibrio entre alcanzar un modelo válido en esta área de investigación y el minimizar el sufrimiento del animal.

El derrame cerebral se induce en roedores y primates no humanos mediante la “oclusión temporal o permanente de la arteria cerebral media” (el llamado en inglés modelo MCAO). Este modelo MCAO tiene como objetivo reproducir de forma experimental la isquemia cerebral focal que tiene lugar durante la embolia, y se ha sido utilizado en numerosas ocasiones, para el estudio de los mecanismos de la lesión, para la identificación de dianas potenciales y para probar agentes neuroprotectores.

En un diseño de estudio estándar, se entrena a los animales para realizar un número de test de comportamiento antes del procedimiento MCAO. Durante el intervalo de tiempo terapéutico que se establece según los mecanismos de acción del fármaco y los objetivos del estudio, se administra a los animales el compuesto de prueba. El análisis resultante debería incluir información sobre el tamaño del infarto, la tasa de mortalidad, la frecuencia de las complicaciones (por ejemplo, hemorragia subaracnoidea), junto con una evaluación funcional y neurológica para monitorizar el proceso. Las imágenes por resonancia magnética han demostrado ser una buena herramienta a la hora de recabar información sobre la variación del tamaño del infarto a lo largo del tiempo, pero también pueden proporcionar información adicional sobre el flujo sanguíneo o el estado metabólico. También pueden incluirse puntos finales histológicos, bioquímicos y moleculares.

Existen varios test de comportamiento que pueden usarse con modelos de embolia. Los más sencillos incluyen sistemas de puntuación neurológica, los cuales evalúan el estado neurológico general, y el test de colocación de las extremidades, que se usan para medir los reflejos motrices. Estos se emplean generalmente para evaluar a los animales en la fase aguda posterior al derrame. En estudios de larga duración, pueden utilizarse tests más complejos para evaluar las funciones sensoriales y motrices (por ejemplo, el test de etiqueta adhesiva bilateral o caminar sobre una barra, un rotarod o una escalera) y funciones cognitivas como la memoria (por ejemplo, test de evitación pasiva, o la evaluación de estrategias de aprendizaje).

Es una buena práctica llevar a cabo un grupo de test de comportamiento, incluyendo al menos uno para cada fase (aguda y largo plazo), para reunir información completa sobre el impacto en las funciones sensoriales, motoras y cognitivas. Estos test tienen que elegirse con cuidado para registrar cualquier efecto de las estrategias terapéuticas a examen. Aquí no se incluyen descripciones detalladas de cada uno de estos test de comportamiento o de planificación de los entrenamientos, pero para una completa revisión y discusión de su uso véase Schaar *et al.*¹

Hay muchas recomendaciones para la investigación preclínica diseñadas para el desarrollo de terapias para el derrame cerebral que proponen el uso de especies de orden superior, tales como primates no humanos, además de los modelos de roedores.²⁻⁵ El tití común (*Callithrix jacchus*) puede considerarse una buena elección de especie para estudiar la fisiopatología y el tratamiento de la isquemia cerebral. Comparado con los roedores, este primate está más cerca de los humanos en lo que se refiere al sistema cerebrovascular, metabolismo cerebral, relación materia gris/materia blanca y muestra una mayor variedad de comportamientos. Además, comparados con otros monos del viejo mundo, son más fáciles de manipular, lo que supone una ventaja para las pruebas de comportamiento y el cuidado postoperatorio. La situación y anatomía de la arteria cerebral media (ACM) en el tití han impedido en el pasado aplicar los modelos utilizados en ratas, y por lo tanto se desarrolló un modelo más invasivo que implicaba retirar un gran colgajo óseo para acceder al cerebro y la ACM. No obstante, más recientemente se ha descrito el método del filamento intraluminal también para el tití.⁶ El método intravascular presenta una serie de ventajas comparado con los métodos usados con anterioridad y claramente debe considerarse como un refinamiento. En particular, la ausencia de craneotomía y lo no invasivo del procedimiento en comparación con otros, tiene como

resultado un menor número de efectos adversos (por ejemplo, discapacidad severa/mortalidad) durante el periodo postoperatorio.

Como sucede con los roedores, las 48 horas posteriores a la intervención son críticas. Los animales tendrán problemas para cuidar de sí mismos y algunas deficiencias pueden incluir hemiparesia del brazo izquierdo, reflejo de agarre anormal, desatención del flanco izquierdo, nistagmo y rotación del ojo.⁷ Por lo general, después de 3-7 días los animales son capaces de cuidar de sí mismos y pueden volver a su jaula. Gradualmente (en unas dos semanas después de la intervención) recuperarán la mayoría de sus habilidades motrices y podrán saltar y trepar libremente por su jaula.

Procedimiento ilustrativo

Diseño del estudio. En este ejemplo sobre la eficacia de un nuevo compuesto, seis machos y seis hembras de tití (*Callithrix jacchus*) criados en laboratorio serán sometidos durante tres horas a MCAO transitoria usando la técnica del filamento intraluminal bajo anestesia general. Antes de la intervención, los titís serán entrenados y se les harán una serie de test neurológicos, que evalúen la función neurológica general, habilidad motriz y percepción espacial. Inmediatamente después de la MCAO, los titís recibirán una inyección en bolo de suero salino ($n=6$) o del compuesto de prueba A ($n=6$) y se les implantarán subcutáneamente mini-bombas osmóticas para administrar una solución salina o el fármaco durante 48 horas. Los déficits sensoriales y motrices se evaluarán cada semana hasta 45 días después de la MCAO y se practicarán resonancias magnéticas bajo anestesia general después de una hora, en el día 8 y el día 45. Los animales serán sacrificados 46 días después de la MCAO.

Consideración de refinamientos específicos y del punto final humanitario

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?	¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?	
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto Final
Entrenamiento para test de comportamiento durante una semana antes de la MCAO: estimulación táctil, escalera de colina y valle, elección entre seis tubos, retirada de adhesivo	Estas son observaciones de comportamiento llevadas a cabo voluntariamente por los animales y no causarán dolor, angustia ni daños duraderos	Todos los test se llevan a cabo en la jaula modificada	Normalmente, se establece un tiempo máximo para llevar a cabo la tarea que corresponda, y se dará una puntuación final. Los animales que no alcancen un nivel mínimo serán excluidos del estudio
Bajo anestesia general, oclusión temporal durante tres horas de la ACM usando un filamento intraluminal introducido a través de la arteria carótida	Dolor y malestar asociados con la intervención Potencialmente puede haber complicaciones quirúrgicas inesperadas, por ejemplo, hemorragia subaracnoidea, lesión retiniana ipsilateral, formación de trombo intraluminal, edema cerebral, afección del hipotálamo con la consecuente hipertermia o necrosis muscular temporal. Estas pueden manifestarse clínicamente de formas diferentes, por ejemplo: desmayo repentino, parálisis, inclinación severa de la cabeza, ataques	Uso de anestesia y analgesia adecuada (efectivos, pero con mínimas propiedades neuroprotectoras) Cirujano bien formado y uso de una técnica quirúrgica aséptica apropiada (revisando con regularidad el índice de éxito) Mantenimiento de homeostasis durante la anestesia Uso de monofilamentos y técnica quirúrgica estandarizados para reducir la variabilidad y complicaciones derivadas de lesiones extensivas	Los animales serán sacrificados en los siguientes casos: Problemas técnicos significativos durante la intervención No recuperación completa después de la anestesia Signos de complicaciones quirúrgicas inesperadas Si la pérdida de peso del animal excede el 20% del peso anterior a la intervención, a pesar de darle un alimento adicional y/o rehidratación, o si

	Efectos potenciales de la anestesia o variables fisiológicas, por ejemplo, hipotermia, hipotensión, hipoxia Ingesta reducida de nutrientes como resultado de un nivel de consciencia reducido, masticación deficiente y baja motilidad, generalmente en las 48 posteriores a la MCAO	Cuidados intensivos postoperatorios durante los primeros 3-5 días, incluyendo fuentes externas de calor. Controles regular del peso, observación y cuidado de las heridas diarios Proporcionar fácil acceso a alimento y comida durante el periodo de recuperación, o alimento adicional (papilla, líquido) y ayuda para comer si es necesario, rehidratación (administración IV de suero salino) si es necesario	permanecen inmóviles durante más de 24 horas
Inyección IV de un bolo de suero salino/compuesto a testar, seguida de la implantación subcutánea de una mini-bomba bajo anestesia general (como parte del procedimiento quirúrgico de la MCAO, no se requiere anestesia adicional)	Dolor y malestar relacionados con el procedimiento quirúrgico (implantación de la mini-bomba) No se esperan efectos adversos con la dosis administrada	Se observarán estrechamente los animales para detectar efectos adversos de los compuestos a testar	Se eutanasian los animales si se detectan efectos secundarios severos derivados de los nuevos agentes terapéuticos
Test de comportamiento llevado a cabo todos los días durante la primera semana después de la MCAO, y una vez a la semana durante seis semanas: estimulación táctil, escalera de colina y valle, elección entre seis tubos, retirada de adhesivo	Los animales pueden encontrar las tareas estresantes si sus habilidades motrices están afectadas	Monitorizar indicadores de comportamiento de la ansiedad o sufrimiento Los animales serán observados de forma constante por personal experimentado	Normalmente, se establece un tiempo máximo para llevar a cabo la tarea, y se da una puntuación final
Resonancia magnética bajo anestesia a la hora, 8 días y 45 días después de la MCAO	Anestesia repetida Efecto de la anestesia, y variables fisiológicas (hipotermia, presión arterial, gases en sangre arterial) como resultado de la embolia	Uso de anestésicos y analgésicos adecuados (efectivos, pero con mínimas propiedades neuroprotectoras) Mantenimiento de la homeostasia durante la anestesia	Los animales que no se recuperen totalmente de la anestesia serán eutanasiados

Análisis prospectivo inicial. Este modelo se considera SEVERO por los procedimientos quirúrgicos que requiere y los efectos perniciosos de la oclusión de la ACM en el bienestar del animal, en especial durante la primera semana. Sin embargo, los cuidados intensivos en las primeras 48 horas y hasta los primeros 7 días, junto con una atenta monitorización de la fase siguiente pueden contribuir en gran manera a reducir el impacto negativo sobre el bienestar animal. Desde el punto de vista experimental, la atención al refinamiento y la estandarización de cada uno de los pasos de los que se compone el procedimiento pueden llevar a una incidencia y variabilidad más reducida de las complicaciones, y como consecuencia, a una mejor calidad de los datos obtenidos y, por tanto, a una reducción del número de animales requeridos.

Entre el investigador, el veterinario y los técnicos, debería acordarse el uso de una hoja de puntuación clínica para establecer los criterios para la monitorización y la eutanasia; esta necesitará contener una puntuación neurológica, junto con otros criterios clínicos tales como el peso corporal, la capacidad de cuidar de sí mismos o la reacción ante estímulos.

¿Podría la clasificación de severidad ser MODERADA?

El entrenamiento y la experiencia del personal implicado, la supervisión veterinaria, y los cuidados intensivos en el periodo posterior a la MCAO, así como la aplicación de un punto final previamente acordados, pueden reducir considerablemente la incidencia de efectos negativos experimentados por los animales.

Observación clínica/Sistema de puntuación.

Los animales se monitorizan cuidadosamente durante el periodo postoperatorio. Se proporcionan analgésicos y terapia local adicional.

Al final de esta sección se incluye un ejemplo de sistema combinado de puntuación neurológico/clínico, utilizado para monitorizar la condición clínica de los animales a lo largo del procedimiento.

Resultados y evaluación de la severidad. Todos los animales se recuperaron de la intervención sin complicaciones inesperadas. La puntuación clínica de todos los animales fue similar durante las 48 horas posteriores a la MCAO, y todos ellos recibieron cuidados intensivos postoperatorios. No se observó un déficit ipsilateral significativo después de inducir la isquemia, ni en los animales control, ni en los que fueron tratados. En todos los animales se observó una recuperación parcial del déficit neurológico contralateral.

- Los seis animales tratados con el vehículo desarrollaron un déficit neurológico contralateral moderado, junto con un bajo rendimiento en los test de comportamiento en comparación con los animales tratados. No obstante, la puntuación clínica mejoró con el tiempo, posiblemente como resultado de su capacidad para compensar y adaptarse a déficits neurológicos de larga duración. Evaluación: SEVERA
- 2 de los 6 animales tratados desarrollaron déficit neurológico contralateral moderado, junto con un bajo rendimiento en test de comportamiento en comparación con los animales tratados. No obstante, la puntuación clínica mejoró con el tiempo, posiblemente como resultado de su capacidad para compensar y adaptarse a déficits neurológicos de larga duración. Evaluación: SEVERA
- 4 de los 6 animales tratados dieron muestras de una mejora significativa en la puntuación neurológica después de las 48 horas posteriores a la MCAO, junto con una mejoría en la puntuación clínica. Evaluación: MODERADA

En conclusión, en 8 animales se consideró como SEVERA y en 4 como MODERADA.

Ejemplo de observación clínica/sistema de puntuación

La evaluación de la severidad se lleva a cabo mediante una combinación de las observaciones clínicas generales (peso corporal, apariencia, comportamiento) junto con una evaluación neurológica específica del procedimiento. La puntuación neurológica utilizada fue una versión modificada de la descrita por Bihel *et al.*, por la que se evalúa de forma separada para cada lado del cuerpo (ipsilateral y contralateral respecto a la lesión MCAO)⁶ la ausencia (0 puntos), presencia moderada (1 punto) o presencia (2 puntos) de un número de movimientos/posturas anormales.

	Puntuación
Apariencia	
Pérdida de peso del 5-10%	1
Pérdida de peso del 11-15%	2
Pérdida de peso del 16-20%	3
Pérdida de peso del 20% o más	Punto Final
Falta de acicalado	1

Piloerección leve	2
Piloerección notable	3
Comportamiento	
Marcha levemente anormal	1
Marcha marcadamente anormal	2
Problemas de movilidad significativos	3
Inmovilidad >24 horas	Punto Final
Tensión y nerviosismo al ser manejado	2
Notable angustia al ser manejado, por ejemplo, agitación, vocalización, agresividad	3

Por otro lado, se realizará una puntuación neurológica. Las extremidades se evaluarán de forma independiente, siendo 10 la puntuación máxima hemilateral. En los animales control, se espera una puntuación alta (hasta 10) en el lado contralateral del cuerpo durante la primera semana tras la MCAO, recuperándose gradualmente en las siguientes semanas. No se espera un déficit ipsilateral significativo, ya que esto significaría que el área isquémica es demasiado grande.

Puntuación neurológica			
Puntuación	Ausencia	Presencia leve	Marcada presencia
Las extremidades delanteras resbalan o cuelgan por debajo de la percha, en reposo o durante el movimiento	0	1	2
Las extremidades traseras resbalan o cuelgan debajo de la percha, en reposo o durante el movimiento	0	1	2
Mano cruzada en el pecho	0	1	2
Cabeza inclinada (antes y después de la estimulación)	0	1	2
Falta de reacción a estímulos visuales	0	1	2

Cada extremidad se evaluará y puntuará por separado. En la primera semana post-MCAO se espera un déficit neurológico contralateral severo junto con unas pobres condiciones clínicas, mientras que el daño neurológico ipsilateral debería estar muy limitado o ausente.

La puntuación neurológica para cada extremidad se sumará a la puntuación de la observación clínica para obtener una puntuación acumulada.

Semana 1 post-MCAO

Se sabe que inmediatamente después de la MCAO debe esperarse una elevada puntuación acumulada, con una mejoría progresiva durante la primera semana tras la intervención. Durante este periodo **crítico**, los animales recibirán cuidados intensivos y serán monitorizados con frecuencia bajo la supervisión de un veterinario. En particular, las primeras 48-72 horas son cruciales para identificar potenciales complicaciones quirúrgicas y asegurar que los efectos adversos son identificados y se emprenden acciones para paliarlos a tiempo.

≥ 22 puntos = Punto Final

Semanas 2-6 post-MCAO

1 a 10 puntos: monitorizar con regularidad, evaluar junto con la puntuación clínica

10 a 20 puntos: monitorizar frecuentemente, proporcionar cuidados al animal si no puede cuidarse por sí mismo, evaluar la puntuación clínica y revisar en conjunto todos los datos

experimentales de los que se disponga (Ej. resonancia magnética, test de comportamiento) para descartar complicaciones inesperadas, tales como una hemorragia cerebral, edema, etc.

≥ 20 puntos = Punto Final

Ejemplo de una hoja de observación para un individuo (Días 0-4)

Día	0	1	2	3	4
Apariencia					
Peso corporal (g) (puntuación)	340(1)	305(3)	320(2)	323(2)	335(1)
Pelaje descuidado/piloerección	1	1	1	1	1
Comportamientos					
Marcha	3	3	3	3	3
Respuesta a la manipulación	0	0	2	0	0
Puntuación clínica total	4	7	8	5	5
Puntuación neurológica total	15	14	14	10	10
Volumen de la lesión (evaluado mediante resonancia magnética)*	7%				
Otras observaciones	Recuperación de la intervención sin complicaciones	Movimiento alrededor del incubador (con severo déficit contralateral)		Intento de alcanzar el alimento con la mano ipsilateral	

*"Volumen de la lesión" (evaluado mediante resonancia magnética) se incluye para que el investigador lo complete al final del estudio. Esta información puede después contrastada con las observaciones clínicas y de comportamiento, para permitir un posterior mayor refinamiento de la monitorización, cuidado del animal y de los procedimientos.

Referencias

1. Schar KL, Brenneman MM and Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* 2010; 2: 13.
2. Freret T, Bouet V, Toutain J, et al. Intraluminal thread model of focal stroke in the non-human primate. *J Cereb Blood Flow Met* 2008; 28: 786–796.
3. Freret T and Bouet V. Improvements of the stroke model guidelines: animal body weight and long-term functional concerns. *Exp Transl Stroke Med* 2009; 2: 28–31.
4. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30: 2752–2758.
5. Virley D, Hadingham SJ, Roberts JC, et al. A new primate model of focal stroke: endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion and reperfusion in the common marmoset. *J Cereb Blood Flow Met* 2003; 24: 24–41.
6. Bihel E, Pro-Sistiaga P, Letourneur A, et al. Permanent or transient chronic ischemic stroke in the non-human primate: behavioural, neuroimaging, histological, and immunohistochemical investigations. *J Cereb Blood Flow Met* 2010; 30: 273–285.
7. Marshall JW and Ridley RM. Assessment of cognitive and motor deficits in a marmoset model of stroke. *ILAR J* 2003; 44: 153–160.

Evaluación cardiovascular de nuevos agentes terapéuticos – modelo telemétrico en perros

Contexto general

Cualquier fármaco que vaya a comercializarse deberá probar tanto su eficacia, como su seguridad. Por lo tanto, incluso compuestos que estén destinados a uso en áreas muy diferentes (por ejemplo, la neurofarmacología) tienen que evaluarse por sus potenciales efectos cardiovasculares.

Los efectos cardiovasculares de los compuestos pueden probarse de muchas maneras: en procedimientos terminales invasivos en animales anestesiados, en animales inmovilizados momentáneamente y equipados con aparatos de monitorización externos, o en animales que se muevan libremente a los que previamente se les hayan implantado aparatos de monitorización (sistemas telemétricos). En las últimas décadas, los sistemas telemétricos se han utilizado con creciente frecuencia en la investigación y desarrollo de fármacos para medir variables fisiológicas y bioeléctricas (por ejemplo, presión sanguínea, ritmo cardiaco, ECG).¹ El no tener que limitar o inmovilizar a los animales de laboratorio durante las mediciones proporciona una oportunidad única para estudiarlos sin estrés o perturbaciones fisiológicas adicionales (anestesia) y durante un periodo de tiempo más largo. Además, entre las diferentes mediciones, los animales pueden estar alojados en grupo.

La telemetría también puede hacer que se necesite un número menor de animales. Primero, los animales pueden usarse como sus propios controles, reduciendo la variabilidad de los datos y en consecuencia el número de animales que se necesitan en cada grupo de tratamiento, ya que los sistemas telemétricos son estables durante meses (y posiblemente incluso años). Segundo, la telemetría proporciona la capacidad de registrar de forma continuada una serie de variables, por lo que hay un aumento significativo en la cantidad de información que puede obtenerse de un determinado número de animales, en comparación con el uso de métodos convencionales. En tercer lugar, al no haber factores estresantes potenciales, tales como la inmovilización o los catéteres externalizados, la calidad de la información que se obtiene, mejora. Los sistemas telemétricos también pueden proporcionarnos indicadores del bienestar animal para ayudarnos a implementar de forma más temprana el momento de punto final.² Por lo tanto, la telemetría es reconocida como beneficiosa para la ciencia, así como capaz de reducir el impacto en el bienestar animal. Sin embargo, no debería subestimarse la necesidad de que se posea una formación quirúrgica apropiada, ya que esto tiene un impacto directo en el bienestar animal. Una formación básica y avanzada en cirugía experimental y un buen conocimiento del funcionamiento de los aparatos son indispensables antes de avanzar hasta la inserción de implantes.

Procedimiento ilustrativo

Diseño del estudio. En este ejemplo se utilizarán tres machos de perro Beagle previamente seleccionados (de un temperamento adecuado). Los animales actuarán como sus propios controles.

Después de haber ayunado por la noche, los animales serán anestesiados. Se les implantarán quirúrgicamente dispositivos telemétricos que permiten la medición continuada de la temperatura corporal y parámetros cardiovasculares (ECG, presión sanguínea). La implantación de estos dispositivos es mediante un procedimiento quirúrgico que no invade cavidades corporales, ya que el emisor no se implanta de forma intraperitoneal, sino en una bolsa intermuscular. El catéter se inserta en la arteria femoral y después avanza hasta la aorta. Los electrodos del ECG se disponen subcutáneamente. El malestar provocado está relacionado con la implantación y las heridas creadas y con la necesidad de que los animales sean anestesiados.

Durante el periodo de recuperación de tres semanas, los animales serán entrenados para estar aislados socialmente durante dos horas (el periodo de las mediciones telemétricas).

Después de su recuperación, el procedimiento requiere un uso continuo: los animales serán tratados semanalmente (un día con vehículo y otro con compuesto) para evaluar los efectos del nuevo agente terapéutico en dos dosis diferentes. Entre cada toma de datos, los animales se alojarán en grupos socialmente. Se permitirá un tiempo mínimo “de lavado” (wash-out) entre las sesiones de prueba (como quedó determinado por los estudios previos de farmacocinética).

El estudio intenta evaluar los potenciales efectos cardiovasculares de nuevos agentes a unas dosis terapéuticas propuestas.

Al final del experimento, se alojará a los animales socialmente, mientras se espera una posible reutilización.

Consideración de refinamientos específicos y del punto final humanitario

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?		¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto final
Preparación del animal previa a la cirugía	Alojamiento individual previo a la intervención Retirada de alimento la noche antes de la intervención		Nada que reseñar
Implantación quirúrgica de dispositivos telemétricos	Posible dolor y malestar Potenciales efectos adversos de la anestesia y la cirugía (hipotermia, deshidratación, angustia durante la recuperación)	Cuidados perioperatorios adecuados: anestesia y analgesia apropiadas. Control del dolor y la angustia no farmacológico: técnica aséptica, calor, personal bien formado, procedimiento quirúrgico optimizado.	Eutanasia durante la intervención si surgen y persisten complicaciones inaceptables
Periodo de recuperación (3 semanas) incluyendo entrenamiento	Posible dolor, infección, malestar Complicaciones posoperatorias Alojamiento individual durante el periodo posoperatorio (24 horas) y entrenamiento (2 horas al día)	Cuidados postoperatorios adecuados (analgésicos, antibióticos) según convenga Observación y cura de la herida a diario	Todo animal con signos clínicos de infección será examinado, tratado y temporalmente excluido del estudio
Administración de compuestos a testar (intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, oral) antes de registrar los parámetros	Posible malestar transitorio después de la administración del compuesto Efectos secundarios inesperados del compuesto Se aloja a los animales individualmente durante periodos cortos (determinados por la previa farmacocinética del fármaco)	Se monitorizan de forma continuada la presión sanguínea, ECG y temperatura corporal en el animal que se puede mover libremente, alojado en jaula provista de receptor telemétrico. Entre estudios los animales se alojan en grupos y son observados a diario Se registra el peso semanalmente	En caso de efectos secundarios prolongados después del tratamiento con el compuesto a testar: posibilidad de tratar y permitir al animal un periodo mayor de "lavado" y examen clínico, antes de la administración de una nueva dosis. Decidir si posible eutanasia. Batería agotada: el animal se propone como candidato a ser reutilizado como donante de sangre o, si lo autorizan las autoridades competentes, se retira el implante y en función del examen veterinario el animal es propuesto para realojarlo en adopción o reutilizarlo como donante de sangre

Evaluación inicial prospectiva. El procedimiento se clasifica como MODERADO ya que requiere anestesia e intervención quirúrgica.

No se espera que la administración del compuesto tenga efectos clínicos en el animal. No obstante, la administración del compuesto es LEVE, ya que requiere una inyección atendiendo a las buenas prácticas veterinarias.

¿Podría la clasificación de severidad ser LEVE?

No, el procedimiento implica anestesia y cirugía; por lo tanto, la clasificación es MODERADA.

Sin embargo, en caso de haber reutilizado animales previamente implantados en otro proyecto, que solo requirieran la administración y evaluación a través de la telemetría de los compuestos de prueba a unas dosis terapéuticas, que no impliquen su inmovilización (se muevan libremente), la severidad prospectiva se clasificaría como LEVE.

¿Podría la clasificación de severidad ser SEVERA?

Sí, si el compuesto de prueba a las dosis administradas tiene efectos tóxicos (cardiovasculares u otros). Esto seguramente significaría que el diagrama de flujo de pruebas no es preciso, ya que un modelo de telemetría no pretende evaluar dosis tóxicas, sino las dosis clínicas/terapéuticas de los compuestos y por ello, el diseño del estudio debería ser revisado.

Observación clínica/Sistema de puntuación. Los animales son monitorizados atentamente durante todas las etapas del procedimiento. Se desarrollaron una hoja específica de anestesia, y una hoja de observación clínica, que se incluyen al final de esta sección. Durante los procedimientos, se registra toda observación clínica diariamente. Durante los periodos de lavado, los animales son observados y pesados al menos una vez a la semana.

Resultados y evaluación de la severidad real. Tres perros fueron sometidos al procedimiento. Todos se recuperaron de la intervención sin complicaciones y no se observaron efectos secundarios cardiovasculares en ninguno de los animales a ninguna de las dosis que se probaron.

Se consideró que los tres animales habían experimentado una severidad MODERADA. Al final del procedimiento se volvió a alojar socialmente a los animales. El nivel de severidad fue MODERADO, debido a la implantación quirúrgica a la que se sometió a los animales, pero el estado de salud general de los animales se recuperó totalmente. No se observó severidad acumulada debida a la administración del agente terapéutico a probar. Por lo tanto, se consideró que los animales podrían ser reutilizados en futuros procedimiento LEVES, MODERADOS o SIN RECUPERACIÓN, tras un periodo de lavado apropiado y contando con la opinión favorable de un veterinario.

Ejemplo de observación clínica/hoja de puntuación

Hoja de seguimiento postoperatorio			Microchip: Lote:		Número del perro: Nombre del perro:			Investigador: Fecha intervención:					
Identificación del procedimiento			Fecha de llegada:		Peso:		kg		Aparato telemétrico lote número:				
Fecha	Peso kg	Hora Temperatura °C	*Cuidado postoperatorio						Observaciones y otras acciones	Visto bueno			
			Consumo alimento	Consumo agua	Producción orina	Producción heces	Aspecto de la herida	Otro			Analgésicos	Antibióticos	Cuidado de la herida
D-1													
D 0													
D 1													
D 2													
D 3													
D 4													
D 5													
...													
D 17													
D 18													
D 19													
D 20													

(*) Administrar analgésicos y antibióticos de acuerdo con el procedimiento
Si se detectan anomalías, contactar con el veterinario

modelos en ratas, perros, cabras, ovejas y, más recientemente, en ratones genéticamente alterados³. El grado de severidad y lo invasivo del modelo dependerán de las causas subyacentes que se estudien.

El *screening* basado en mecanismos electrofisiológicos, iónicos y moleculares en modelos *in vitro* permite la identificación de compuestos potencialmente eficaces, que a continuación se evalúan en modelos *in vivo*. El modelo animal ideal para la prueba de fármacos debería ser sencillo, estable, barato, clínicamente relevante, que permita una producción fiable y continuada de FA (para la terminación inducida por los fármacos de prueba) y finalmente permitir una conversión fácil a ritmo sinusal (para estudios de dosis múltiples). El ejemplo que se incluye aquí se refiere a un modelo quirúrgico que ha demostrado una buena reproducibilidad en la producción de FA, causando un malestar clínico mínimo a los animales.

Procedimiento ilustrativo

Diseño del estudio. En este ejemplo se utilizarán diez conejos blancos Nueva Zelanda machos adultos de gran tamaño con una $n=5$ por grupo de dosis (control salino y sustancia a testar). Basándose en el análisis de potencia de datos anteriores (estudios preliminares) se determinó que este era el número mínimo de animales requeridos para el tamaño de la muestra.

Con el objeto de permitir que el compuesto a testar se encuentre presente como tratamiento preventivo con un continuo nivel estable y, se implantará una mini-bomba subcutánea que permitirá la administración del compuesto durante veintiún días. Esto permite no sólo que el fármaco se administre al animal de forma continuada (evitando picos de distribución del fármaco), sino también minimiza las molestias que supone la administración de fármacos para el animal (que podrían causar momentáneos cambios suplementarios en la frecuencia cardíaca y conducir a FA espontánea).

Bajo el mismo procedimiento anestésico, se implantarán electrodos bipolares en la aurícula izquierda y se conectarán a un estimulador eléctrico. El estimulador se colocará en una chaqueta, a la que se habrá acostumbrado a los animales antes de la intervención.

Se dejará un periodo de siete días después de la intervención para que los animales se recuperen completamente. Después, los electrodos implantados serán estimulados a diario durante catorce días consecutivos. Esto permitirá un estímulo gradual, que paulatinamente aumentará el ritmo cardíaco y provocará la FA paroxística, lo que requerirá la manipulación e inmovilización ocasional del animal para modificar los parámetros de estimulación.

Catorce días después, los animales serán anestesiados a término. Una vez que los parámetros hemodinámicos se hayan estabilizado, se provocará la FA mediante un periodo fijado de tiempo de estimulación eléctrica y se medirán los parámetros hemodinámicos y los marcadores biológicos.

Consideración de refinamientos específicos y del punto final

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?	¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?	
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto final
Alojamiento individual (machos adultos quirúrgicamente equipados) Los animales se habituarán a la chaqueta y al peso de la mochila cargada	Puede causar algo de angustia Estrés mínimo por la chaqueta	Proveer enriquecimiento ambiental Manejar con calma y empatía	Si algún animal no se aclimata no será incluido en el estudio

<p>Implantación quirúrgica subcutánea de una mini-bomba que contiene el nuevo agente terapéutico, implantación de electrodos bipolares en la pared cardíaca mediante toracotomía. Administración del agente terapéutico a través de mini-bomba</p>	<p>Complicaciones durante la cirugía y anestesia: hipotermia, arritmia cardíaca, paro respiratorio Dolor y malestar relacionados con la intervención No se espera que la sustancia terapéutica cause efectos adversos significativos (basándose en datos previos).</p>	<p>Cuidados perioperatorios apropiados: técnica aséptica, protocolo anestésico apropiado, respiración artificial, manta de calor, fármacos antiarrítmicos durante la intervención, perfusión intravenosa de solución salina Control del dolor y la ansiedad no farmacológicos: cirujano bien entrenado, procedimiento quirúrgico optimizado para reducir la variabilidad. Se suministrará analgesia de forma rutinaria y se continuará su administración según se indique Uso de personal muy experimentado.</p>	<p>Se tomará la decisión de la eutanasia durante la intervención si persisten complicaciones inaceptables, como por ejemplo arritmias incontroladas o fibrilación ventricular</p>
<p>Periodo de recuperación (7 días) y a continuación estimulación continuada de los electrodos implantados durante 14 días consecutivos</p>	<p>Complicaciones durante la recuperación postoperatoria: Dolor y malestar, hipotermia o hipertermia, dificultad para respirar, arritmias cardíacas, infección de la herida La presencia de la mini-bomba y la difusión del fármaco pueden causar malestar por el emplazamiento de la mini-bomba y/o la difusión del fármaco Se aumenta la frecuencia cardíaca gradualmente. La FA puede ocurrir de repente si el animal está estresado</p>	<p>Cuidados posoperatorios adecuados (calor, alimento, etc.) Un alojamiento apropiado y una chaqueta evitarán que el animal se haga daño o interfiera con los electrodos/lugar de la herida (jaula grande y alta). Masaje diario para prevenir adherencias en la mini-bomba Determinar las dosis máximas a partir de procedimientos anteriores. Cuidados perioperatorios apropiados: Analgésicos y/o fármacos antiinflamatorios apropiados para la especie durante al menos 2 días después de la intervención, dependiendo de la temperatura corporal y signos clínicos Antibióticos/antisépticos tópicos en las heridas en la piel. Monitorización postoperatoria con una hoja de puntuación clínica (temperatura corporal, peso, consumo de alimento, cuidado de la herida, etc.) Los animales están habituados al peso de la mochila Control clínico diario de los animales. Alojamiento y manipulación en condiciones no estresantes.</p>	<p>Eutanasia si la pérdida de peso excede el 20% del peso corporal inicial en menos de 48 horas Se tomará la misma decisión si persisten complicaciones inaceptables durante el periodo postoperatorio (signos clínicos de angustia; no recuperan el estado normal 48 horas después de la intervención) Los animales con signos clínicos de infección serán examinados y tratados</p>
<p>Anestesia terminal (con FA provocada) 14 días después</p>	<p>FA puede ocurrir espontáneamente, presentándose como muerte súbita (muy rara) sin signos clínicos</p>	<p>Anestesia y analgesia apropiadas</p>	<p>Los animales serán sacrificados mediante sobredosis anestésica si la fibrilación tiene lugar espontáneamente antes de que comience la fibrilación provocada (ya que la sustancia de prueba claramente no es eficaz). En caso contrario serán sacrificados</p>

Evaluación inicial prospectiva. El estudio pretende evaluar la eficacia de nuevos agentes terapéuticos a la hora de prevenir/minimizar la aparición de FA después de la estimulación eléctrica de la aurícula izquierda.

La implantación subcutánea de la mini-bomba es un procedimiento muy rápido que solo lleva un par de minutos a una persona experimentada. La cirugía torácica es un procedimiento invasivo. Es necesario anestesiarse al animal y la intervención probablemente provoque dolor y malestar. La estimulación cardíaca en sí no parece causar ningún dolor, ni malestar visible: los animales no parecen reaccionar al aumento de la frecuencia cardíaca cuando tiene lugar de manera lenta y progresiva.

Se considera apropiada una severidad prospectiva MODERADA.

¿Podría la clasificación de severidad ser LEVE?

No, la cirugía torácica provocará dolor y malestar, aunque serán minimizados por el alivio del dolor y técnicas quirúrgicas acordes con las mejores prácticas.

Este procedimiento implica cirugía compleja, incluso si sólo se tratara de la implantación de la mini-bomba sería necesario el uso de anestesia.

¿Podría la clasificación de severidad ser SEVERA?

Si por el motivo que sea no se proporcionan analgésicos adecuados durante y tras la intervención, el procedimiento podría potencialmente provocar dolor severo.

Si la estimulación cardíaca no fuera gradual, podría provocar FA espontánea, que podría conllevar la muerte espontánea del animal y por lo tanto debería clasificarse como SEVERA.

Esto es poco probable, y debería ocurrir muy rara vez con una estimulación progresiva adecuada.

Observación clínica/Sistema de puntuación. Los animales son monitorizados atentamente durante todas las etapas del procedimiento usando un registro especial de anestesia y una hoja de observación clínica. En el periodo postoperatorio, se proporcionan analgésicos y terapia local de apoyo según proceda y se registran en una hoja de observación clínica por cada individuo. Las hojas se completan a diario e incluyen datos sobre el peso corporal, temperatura corporal, signos clínicos, tratamientos postoperatorios estándares y cualquier otro tratamiento. También se registran las estimulaciones y las reacciones a ellas. Al final de esta sección se incluyen ejemplos de hojas de observación.

Resultados y evaluación de la severidad real. Diez animales fueron sometidos al procedimiento. Todos se recuperaron de la intervención sin complicaciones. Un animal en el grupo de control de solución salina fue hallado muerto poco después de la primera estimulación eléctrica. Todos los demás animales fueron sometidos a anestesia terminal, durante la que se evaluó la eficacia del agente terapéutico en comparación con el vehículo.

Evaluación de severidad para los cinco animales tratados con solución salina:

- 1 de los 5 conejos fue hallado muerto el día 11 (primera estimulación eléctrica): SEVERA
- 4 de los 5 terminaron el procedimiento de anestesia terminal: MODERADA
- Se utilizaron 5 animales tratados con el compuesto. Los 5 completaron el procedimiento de anestesia terminal: MODERADA

Ejemplo de hoja de seguimiento del postoperatorio

Formulario de seguimiento postoperatorio			Tatuaje:		Conejo número:		Investigador:	
			Lote:				Fecha implantación estimulador:	
			Fecha de llegada:		Peso:		kg	
Fecha	Peso: kg	Hora (H)	Cuidados posoperatorios*					Visa

		Temperatura (T°)	Analgésicos	Antibióticos	Otros fármacos	Observaciones y otras acciones	
D-1		H: T°:					
D 0		H: T°:					
D 1		H: T°:					
D 2		H: T°:					
D 3		H: T°:					
D 4		H: T°:					
D 5		H: T°:					
D 6		H: T°:					
D 7		H: T°:					
D 8		H: T°:					
D 9		H: T°:					
D 10		H: T°:					
D 11		H: T°:					
D 12		H: T°:					
D 13		H: T°:					
D 14		H: T°:					

Referencias

1. Benson MD, Ju Li Q, Kieckhafer K, et al. SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *PNAS* 2007; 104: 1805–1810.
2. Burashnikov A and Antzelevitch C. Role of late channel current block in the management of atrial fibrillation. *Cardiovasc Drugs Ther* 2013; 27: 79–89.
3. Nattel S, Shiroshita-Takeshita A and Brunde BJ. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis* 2005; 48: 9–28.

Determinación de la ecotoxicidad de una sustancia a testar – test de bioconcentración con flujo constante en peces

Contexto general

El test de la bioconcentración tiene como objetivo determinar el potencial de bioacumulación de una sustancia química en tejidos de un pez, cuando ésta es activada por (entre otros) su coeficiente de reparto octanol-agua. Este es un requerimiento legal para todos los compuestos químicos cuando existe la posibilidad de que estén en contacto con un ambiente acuático. Puede llevarse a cabo un estudio con exposición en el agua; esto proporcionará un factor de bioconcentración (BCF, en inglés, es el índice de concentración en peces, dividido por la concentración en el agua). El estudio también puede llevarse a cabo mediante exposición en el alimento (cuando la sustancia se disuelve en el agua con dificultad), lo que proporcionará el factor de biomagnificación (BFM, en inglés, es el índice de concentración en peces dividido, entre la concentración en alimento).

El BCF y el BFM se usan en la evaluación de la persistencia, bioacumulación y toxicidad (PBT, en inglés) y alta persistencia y alta bioacumulación (vPvB, en inglés), y se usa para la evaluación de riesgos ambientales para la cadena trófica acuática (Ej. agua – pez – depredadores superiores como aves y mamíferos). Si una sustancia es bioacumulativa se acumulará en los organismos vivos una vez que se incorpore al entorno, lo que puede conllevar efectos adversos para otros eslabones de la cadena trófica. Una sustancia que cumple todos los criterios de PBT y/o vPvB se identificará como una sustancia PBT/vPvB. Las sustancias que se identifiquen como PBT o vPvB son consideradas candidatas para su

sustitución, lo que implica que deberán reemplazarse por sustancias que no sean PBT/vPvB, si es posible.

Todas las sustancias (sustancias químicas industriales y agrarias, biocidas y fármacos para humanos y animales) requieren una evaluación PBT/vPvB. Aunque se conocen algunas relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) disponibles, estas no son siempre adecuadas, en función de la estructura molecular o las características fisicoquímicas de la sustancia química. Además, las QSARs estimarán únicamente el BCF de la sustancia química inalterada, mientras que un estudio en peces permite determinar la degradación de los productos y el tiempo de su eliminación desde que se transfieren a un agua sin contaminar.

Las especies de peces usadas en este estudio pueden incluir: carpa (*Cyprinus carpio*), pez cebra (*Danio rerio*), carpita cabeza (*Pimephales promelas*), pez sol (*Lepomis macrochirus*) o la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Procedimiento ilustrativo

Diseño del estudio. El estudio se lleva a cabo basándose en las directrices de la OCDE para la evaluación de sustancias químicas, Directriz 305: Bioacumulación en peces: Exposición a través del agua y de la dieta, octubre de 2012.¹ El procedimiento está diseñado para cumplir los métodos de evaluación determinados por la Regulación de la Comisión (CE) Número 440/2008 del 30 de mayo de 2008, Sección C: Métodos para la determinación de la ecotoxicidad, Publicación número L142, C.13 “Bioconcentración: test de flujo constante en peces”.² Se expone a los peces durante una fase de absorción de 28 días y una fase de depuración de 56 días. La duración de ambas fases puede variar en función del proceso de absorción y/o depuración. Durante la fase de absorción, un grupo de peces es expuesto a la sustancia a testar, en una o más concentraciones predeterminadas. El número de peces por concentración a testar se determina de tal forma que se disponga de un mínimo de cuatro peces en cada punto de toma de muestras. Los peces se mantienen en un tanque con un flujo constante de agua, a la que se añade la sustancia de prueba durante la fase de absorción. El volumen de agua debería renovarse al menos cinco veces al día. Se usan concentraciones no tóxicas de las sustancias de prueba. Puede usarse el marcado radioisotópico de la sustancia de prueba con fines analíticos. Se toman muestras de agua antes de y durante la fase de absorción. Se selecciona a los peces para tomar muestras de tejido después de realizarles la eutanasia en momentos secuenciales de la fase de absorción (por ejemplo 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días) y la fase de depuración (30, 35, 42, 56 y 84 días); y para la extracción de lípidos en los días 0 y 28 de exposición. Se pesa a los animales antes del test y post mortem; se toman muestras de los peces durante el test y post mortem. Se necesitan cuatro o más peces para cada toma de muestras y para cada concentración de prueba. Se utilizarán un total de 130 truchas arcoíris, que se expondrán a dos concentraciones diferentes de una sustancia a testar: 32 se utilizarán para el grupo de control (con una repetición) y 49 para la concentración a testar (dos repeticiones).

Consideración de refinamientos específicos y del punto final humanitario

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?	¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?	
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto final
Se capturan, pesan y miden los peces utilizados en el estudio	Agitación leve debida a la captura/manejo	Buenas prácticas, equipamiento/técnicas apropiados	Punto final si hay por ejemplo hemorragias, lesiones en la piel, defectos en las

			branquias, posición anormal al nadar durante dos o más días, convulsiones
Los peces se mantienen en la solución a testar con un sistema de flujo constante y concentraciones de la sustancia a testar completamente disueltas	Sin signos clínicos, o signos clínicos leves	Ninguna Acción	Punto final, por ejemplo, si hay hemorragias, lesiones en la piel, defectos en las branquias, posición anormal al nadar durante dos o más días, convulsiones
Eutanasia por sobredosis anestésica o golpe en la cabeza: Algunos peces seleccionados se capturan con red, enjuagan, secan y sacrifican al instante mediante golpe en la cabeza, seguido de incisión cervical; Los demás peces son sumergidos, al final del procedimiento en una solución para eutanasia, por ejemplo, Metanosulfonato de tricaina (TMS, MS-222), 2-fenoxietanol	Agitación leve debida a la captura/manejo inmediatamente seguida de eutanasia o anestesia-eutanasia, respectivamente	Buenas prácticas, equipamiento/técnicas apropiados Buena monitorización/control del procedimiento la eutanasia (calidad, concentración, efectos)	Ninguna Acción

Evaluación inicial prospectiva. Se espera que los animales experimenten sólo malestar LEVE por la exposición a cantidades no tóxicas de la sustancia de prueba, y el uso de buenas prácticas para su manipulación y eutanasia.

Por lo tanto, se considera apropiada una clasificación prospectiva de severidad LEVE.

¿Podría la severidad ser MODERADA?

Normalmente no, ya que durante la fase de bioacumulación se esperan solo efectos adversos leves o ningún efecto adverso, y por lo tanto solamente malestar LEVE, considerando el uso de dosis no tóxicas y un manejo y eutanasia llevados a cabo de acuerdo con las buenas prácticas. Si en contra de las expectativas, los signos clínicos indicaran una severidad moderada, se tomaría una decisión informada durante el seguimiento del experimento, como, por ejemplo, la eutanasia del animal basada en el criterio de punto final, intensificación de la monitorización, o necesidad de cambiar la clasificación de la evaluación prospectiva de la severidad de experimentos similares, notificándose a la autoridad competente.

Observación clínica/Sistema de puntuación. Los animales se monitorizan diariamente atendiendo a la mortalidad/viabilidad y cualquier efecto adverso. Cualquier hoja de puntuación clínica y de observación deben acordarse entre los investigadores, veterinarios y técnicos para establecer los criterios de monitorización y eutanasia (punto final).³⁻⁵ Es posible el uso temporal de luz para facilitar la observación, pero esto debería ser limitado. Los peces se observan para detectar efectos adversos y mortalidad entre las 2 y 4 horas, y al final del día para detectar otros posibles efectos adversos y mortalidad y así poder determinar los puntos finales. Los siguientes mañanas, se revisan los peces para detectar las bajas, y la mortalidad y al final del día para detectar algún otro efecto adverso y la mortalidad. Al final de esta sección se incluye un ejemplo de sistema de observación y puntuación clínica utilizados para monitorizar la condición clínica de los animales a lo largo del procedimiento. A menos que se detecten signos clínicos o anomalías típicas (por ejemplo, un comportamiento natatorio distintivo o la aleta/cola dañadas) en un individuo o un número muy reducido de peces, cualquier tipo de seguimiento o reidentificación de un pez individual será imposible o muy difícil. Si es posible identificar un individuo afectado para subsiguientes observaciones, esto nos puede ayudar a la hora de monitorizar la condición clínica y facilitar la posible

implementación del punto final. De no ser posible, debería utilizarse el número de peces con los signos clínicos típicos para evaluar la condición del grupo de peces en cada tanque.

Día de observación	Concentración diana		
	Control	Concentración a testar 1	Concentración a testar 2
0	Sin anomalías	Sin anomalías	Sin anomalías
1	1 pez muerto	Sin anomalías	Sin anomalías
etc.			
7	Sin anomalías	Sin anomalías	1 pez muerto
etc.			
14	Sin anomalías	1 pez nadando en círculos	1 pez descolorido
etc.			
16	Sin anomalías	1 pez muerto	1 pez descolorido
etc.			
37	1 pez nadando en círculos	Sin anomalías	Sin anomalías
etc.			
72	Sin anomalías	1 pez sin cola (eutanasia)	Sin anomalías
etc.			

Resultados y evaluación de la severidad real. Durante los 84 días, 124 peces no mostraron ningún signo clínico y se consideró que habían experimentado una severidad LEVE. En la concentración a testar 2, se observó durante tres días consecutivos un pez con decoloración, seguida de una completa recuperación. Es probable que se tratara del mismo pez todos los días. La severidad se consideró LEVE. En el grupo de control, concentración a testar 1 y concentración a testar 2, se halló muerto un pez sin signos clínicos previos. Se consideró la severidad LEVE. Tanto en el grupo de control como en el de concentración a testar 1, un pez nadaba en círculos. Tras consultar con el veterinario encargado, se mantuvo a estos peces en el estudio bajo atenta monitorización. Los signos clínicos desaparecieron a los dos días. La severidad para ambos peces se consideró MODERADA. Finalmente, en la concentración a testar 1, se observó que un pez no tenía cola y se le practicó la eutanasia. Severidad: SEVERA.

Evaluación: LEVE para 127 peces, MODERADA para 2 y SEVERA para 1 pez.

Acciones: ya que los signos clínicos excedieron la clasificación prospectiva de severidad esperada, y tras consultar con los veterinarios, se llevó a cabo una monitorización más atenta y se notificó a la autoridad competente.

Ejemplo de observación clínica/sistema de puntuación

Puede utilizarse una hoja de puntuación clínica para la observación diaria de la mortalidad y los efectos adversos. Esta hoja puede incluir varios signos que se refieran al comportamiento natatorio, pigmentación, apariencia, comportamiento reactivo o convulsiones. Su presencia o ausencia se documentará a diario o con la mayor frecuencia, si procede. Cualquier comportamiento anormal o inesperado debería notificarse al investigador y/o al veterinario designado o al experto en peces adecuadamente cualificado. Ante cualquier efecto adverso severo observado, debería decidirse monitorizar con más frecuencia y/o implementar el punto final. Debido a la falta de identificación y la densidad del grupo, un seguimiento individualizado no es realista.

Más abajo se incluye un ejemplo de una hoja de puntuación clínica.

La evaluación de la severidad se lleva a cabo mediante una combinación de estas observaciones (junto con un procedimiento de evaluación). En el caso de que se combinen las observaciones como se describen en la tabla, se utilizará la puntuación más alta para la evaluación. Si una observación aparece durante más de un día consecutivo, las puntuaciones pueden ser ajustadas (+1, +2 o +3) tras consultarlo con los investigadores, técnicos y/o veterinarios o expertos encargados. La atenta monitorización es de ayuda para la evaluación de la severidad real como LEVE, MODERADA o SEVERA, en especial en casos de muerte

repentina con o sin signos clínicos previos, o para ayudar a tomar decisiones informadas sobre la implementación del punto final. Evaluación de la severidad y acciones sugeridas basadas en la observación clínica:

Descripción	Puntuación ^a	Acción	Evaluación de severidad ^b
Normal natación, comportamiento y apariencias	1	NA	LEVE
Comportamiento natatorio			
Natación en fondo	1	Comprobar similitud con los controles	LEVE
Natación en superficie	1	Comprobar similitud con los controles	LEVE
Bocanada de aire superficie	2	NA	LEVE
Natación vertical	3	Malestar acumulado	MODERADA
Natación de lado o en posición supina	3	NA	MODERADA
Natación en círculo (normal a posición supina)	3	NA	MODERADA
Pigmentación			
Color más oscuro	2	NA	LEVE
Apariencia			
Contracción de la cola	3	NA	MODERADA
Hemorragias/livor mortis	4-5	(Considerar) Punto Final	SEVERA
Daño visible en la piel y/o aletas	4-5	(Considerar) Punto Final	SEVERA
Comportamiento reactivo			
Lento comparado con control	2	NA	LEVE
Inmóvil	2	NA	LEVE
Natación hiperactiva después de chocar con el tanque	2	NA	LEVE
Natación hiperactiva	3	NA	MODERADA
Otro			
Muerte repentina sin signos previos	2	NA	LEVE
Muerte repentina con signos previos	2-5	NA	LEVE, MODERADA o SEVERA
Malestar irreversible como convulsiones	4-5	(Considerar) Punto Final	SEVERA

^aSi una observación está presente también en el segundo o tercer día consecutivo, se añade +1 a la puntuación, 4 días consecutivos +2 y 5 días consecutivos +3. Esto puede facilitar la evaluación de la severidad y la implementación del Punto Final.

^bSi se detecta una combinación de observaciones, la evaluación de severidad se ajustará a la puntuación de severidad más alta de las observaciones presentes.

NA: Ninguna Acción

Referencias

1. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 305: bioaccumulation in fish: aqueous and dietary exposure. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 3: degradation and accumulation*. Paris: OECD Publishing, 2012.
2. European Commission. Commission Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008, Part C: Methods for the determination of ecotoxicity: "Bioconcentration: Flowthrough Fish Test". *Off J Eur Union* 2008; L142: C.13.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*. OECD series on testing and assessment number 23. Paris: OECD Publishing, 2000.
4. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Paris: OECD Publishing, 2000.

5. Humane Endpoints in Laboratory Animal Experimentation. What are humane endpoints?, www.humane-endpoints.info/en (2017, accessed 14 May 2017).

Evaluación de la toxicidad aguda por vía oral con una sustancia de prueba en ratas

Contexto general

Las guías para los test de la Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica (OCDE) son una serie de métodos utilizados para evaluar los riesgos de productos y preparados químicos tales como los pesticidas. Estos métodos abarcan las pruebas que evalúan propiedades físicas y químicas, efectos para la salud humana y la fauna salvaje y la acumulación y degradación en el entorno. Las directrices de la OCDE están reconocidas en todo el mundo como el estándar de referencia para ensayos químicos y se revisan de forma periódica para actualizarlas con los últimos avances científicos y los cambios en las prácticas de evaluación. La información sobre toxicidad aguda se utiliza para cumplir requisitos de clasificación de riesgo y de etiquetado, para evaluar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente y a la hora de evaluar la toxicidad de las mezclas. El objetivo de un estudio de toxicidad **aguda** por vía oral es el de evaluar la toxicidad letal o casi letal de la sustancia a testar tras una única dosis. Se utiliza la vía oral ya que esta puede ser una posible vía de exposición para los humanos.

El test convencional de toxicidad aguda por vía oral (anteriormente, Guía 401 de la OCDE, la clásica dosis letal 50, DL_{50})¹ que requiere más de 20 animales, es el más críticas ha recibido en términos de bienestar animal y esta preocupación fue la que llevó a su eliminación y al desarrollo de tres test alternativos para la toxicidad aguda por vía oral (Guías de la OCDE 420, 423 y 425),²⁻⁴ el método de la dosis fija (420), el método de clase tóxica aguda (423) y el procedimiento up-and-down (425). Todos los test implican administrar la sustancia a testar en dosis graduadas a grupos de animales, los cuales son observados con respecto a sus efectos y mortalidad (o momento de punto final). El resultado que se obtiene es el cálculo de DL_{50} (la dosis que mata al 50% de los animales) o una estimación de DL_{50} . El método de dosis fija no requiere la muerte de los animales como punto final y emplea de media de 5 a 7 animales con una sola muerte. Los procedimientos de clase tóxica aguda y de up-and-down usan de promedio 6 a 9 animales, con 0 a 3 muertes.⁵

Procedimiento ilustrativo

Diseño del estudio. El método de la clase tóxica aguda es un procedimiento en etapas que utiliza tres animales del sexo que sea más susceptible por cada una de estas (si no se conoce, serán hembras). Toda la información disponible sobre la sustancia a testar (identidad y estructura química, propiedades fisicoquímicas, otros test de toxicidad *in vivo* o *in vitro*, información toxicológica sobre sustancias estructuralmente relacionadas, uso(s) anticipado(s) de la sustancia, debería considerarse antes de llevar a cabo el estudio.

La sustancia a testar debería formularse usando un vehículo adecuado y las concentraciones deberían ajustarse para permitir volúmenes constantes en las dosis. Los animales deberán estar en ayunas antes de recibir la dosis para evitar interferencias de los alimentos presentes en el estómago con la sustancia; la directriz requiere un ayuno “por la noche”. Los volúmenes de las dosis se eligen de acuerdo con las buenas prácticas y los vehículos en función de las bases de datos internas/externas de los receptores.

La dosis que se utilizará como primera dosis se selecciona de entre cuatro niveles fijos (5, 50, 300 y 200 mg/kg). Existe la opción de usar una dosis adicional de 5000 mg/kg, pero sólo cuando esto esté justificado por un requerimiento regulatorio específico. El nivel de la dosis inicial debería ser el que vaya a producir mortalidad en algunos de los animales con **mayor**

probabilidad. Cuando la información adicional de la que se disponga indique que la mortalidad es poco probable a la dosis inicial más alta (2000 mg/kg de peso corporal), debería llevarse a cabo un “ensayo límite” (6 ratas, 3 ratas por etapa). Cuando no se disponga de información sobre una sustancia a testar, se recomienda por motivos de bienestar animal usar la dosis inicial de **300 mg/kg** de peso corporal. Dependiendo de la mortalidad y/o del estado moribundo de los animales, se irán añadiendo grupos de animales con dosis fijas más altas o más bajas hasta que se alcance el objetivo del estudio; es decir, la clasificación de la sustancia a testar basada en la identificación de la(s) dosis que causan mortalidad, excepto cuando no haya efectos en la dosis fija más alta.

El intervalo de tiempo entre grupos de tratamiento estará basado en la aparición, duración y severidad de los signos de toxicidad. Se retrasará el tratamiento del siguiente grupo hasta que ya no se espere más mortalidad en el/los grupo(s) a los que se haya administrado la sustancia previamente. Se necesitarán entre 2 a 4 etapas para poder clasificar la sustancia a testar en una de las clases de toxicidad definidas por los valores de corte de la DL₅₀.

En total, se utilizarán seis ratas en este estudio. De acuerdo con el procedimiento por etapas, en la primera etapa se administrará por medio de sonda oral una dosis inicial de 300 mg/kg a tres ratas. Los animales recibirán una única dosis oral y a continuación serán observados durante catorce días. Las observaciones incluyen los signos clínicos, medición de peso corporal y anomalías macroscópicas durante la necropsia al final del periodo de observación, o antes, en caso de que los animales sean hallados muertos o se les sacrifique humanitariamente.

Consideración de refinamientos específicos y del punto final humanitario

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?	¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?	
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto final
Ayuno la noche anterior a recibir la dosis y hasta 3-4 horas después de la dosis de la sustancia a testar. Dispondrán de agua.	No implica dolor, sufrimiento o daños duraderos ya que cada rata sólo ayuna una vez, y no se espera que el peso corporal descienda del 80% de la media del mismo sexo/cepa/edad. Ya que el ayuno se lleva a cabo durante la fase activa y puede alcanzar las 24 horas, la falta de comida se considera Leve ya que puede generar angustia basándose en el comportamiento y la fisiología.	Ayuno que no supere el tiempo recomendado fisiológicamente (6 horas en rata). Científicamente es necesario vaciar el tracto gastrointestinal o mejorar la absorción gastrointestinal de la sustancia, por lo que se prefiere al ayuno de acuerdo con la guía, pero esto requeriría la autorización previa de la autoridad competente. El siguiente grupo (2º) recibirá comida inmediatamente, y no ayunará en caso de que en el primer grupo se haya producido la mortalidad sospechada/prolongada.	Nada que reseñar
Única dosis de la sustancia a testar administrada mediante sonda oral	Malestar transitorio causado por la sonda, considerado Leve. Es esencial una buena técnica de administración de la dosis, pero excepcionalmente puede ocurrir un accidente con la sonda.	Personal bien formado. Elección de la sonda que genere el menor malestar posible (tamaño apropiado, plástico flexible si lo permite la sustancia, diámetro interno relativamente ancho). Buenas prácticas de administración, volúmenes basados en peso/especie: por ejemplo, volumen de dosis máximo 10 ml/kg peso corporal.	Punto final en caso de accidente con la sonda, por ejemplo, esófago perforado (excepcional).

Efecto tóxico inmediato y retardado de la sustancia a testar después de la dosis y en un periodo de observación de 14 días en alojamiento en grupo	Dependiendo de la sustancia, pueden presentarse signos clínicos locales o sistémicos Leves, Moderados o Severos o mortalidad durante el periodo estándar de observación de 14 días.	Máximo 3 dosis individuales en 24 horas en caso de que sean necesarios volúmenes mayores (basado en la concentración de la formulación).	El punto final se determinará en función de la puntuación clínica total. Los animales que muestren signos clínicos severos o que estén moribundos serán sacrificados (esto no compromete los resultados del estudio, ya que estos animales se consideran similares a los que murieron durante el test).
		Monitorización de la mortalidad/viabilidad (al menos 2 veces/día). Monitorización de signos clínicos (al menos 3 veces el día de la dosis y una vez al día desde entonces) y peso corporal (al menos una vez a la semana). Intervalo entre grupos subsiguientes, al menos 24 horas. El siguiente (2º) grupo del siguiente nivel de dosis no ayunará o recibirá comida inmediatamente, en caso de que en el primer grupo se anticipe/prolongue la mortalidad. Estar alerta a la mortalidad/toxicidad retrasadas. La frecuencia/periodo de observación puede aumentarse en función de los signos clínicos (esperados) para minimizar el riesgo de letalidad usando el punto final.	

Evaluación inicial prospectiva. SEVERA: la toxicidad de la sustancia puede alcanzar hasta una severidad **SEVERA**, ya que los niveles de dosis iniciales es probable que causen mortalidad en uno o más animales. Es necesaria la observación frecuente después de la dosis el día 1 (inmediatamente después de la dosis y 2 y 4 horas después) y realizar controles todas las mañanas y tardes para aplicar el punto final y minimizar la severidad.

Por consiguiente, en general es apropiada la clasificación de **SEVERA**.

¿Podría la clasificación de severidad ser MODERADA?

Sí, si la información de la sustancia a testar sugiere que la mortalidad es poco probable a la dosis inicial más alta (2000 mg/kg de peso corporal), y si la mortalidad y todo signo clínico (retrasado) se mantienen ausentes en las 6 ratas (3 animales por etapa), la severidad puede considerarse **MODERADA** o **LEVE**.

Observación clínica. De acuerdo con la guía (OCDE 423), las ratas deberían observarse individualmente después de administrar la dosis al menos una vez durante los primeros 30 minutos, y después periódicamente durante las primeras 24 horas, prestando especial atención en las primeras 4 horas, y a partir de entonces diariamente durante 14 días.³ La duración de las observaciones deberá determinarse en función de las reacciones tóxicas y el inicio y duración del periodo de recuperación, y podrá ampliarse cuando se considere necesario. El peso corporal se mide antes de recibir la dosis y al menos una vez a la semana desde entonces. Los cambios en el peso corporal deben registrarse y usarse para la evaluación del bienestar y/o establecer el punto final. Cualquier anormalidad macroscópica durante la necropsia puede resultar útil para confirmar que el momento de punto final era correcto. Podrían ser necesarias observaciones adicionales si continúan los signos de toxicidad. Las observaciones deberían contemplar cambios en la piel y el pelaje, ojos y membranas mucosas, y también el sistema respiratorio, circulatorio, y los sistemas nerviosos central y autónomo, así como la actividad somatomotora y patrones de comportamiento. Deberá prestarse atención a

la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Deberían tenerse en consideración los principios y criterios resumidos en el Documento de pautas para los puntos de terminación compasiva de la OCDE.⁶ Los animales que se encuentren en un estado moribundo, o que den muestras de dolor o angustia severos, deberán ser sacrificados de forma humanitaria.

Resulta de utilidad el uso de una hoja de puntuación (Informe del grupo de trabajo de FELASA, 2015) para monitorizar el bienestar animal e identificar el momento de punto final, así como informar de acuerdo con las directrices de la OCDE.^{6,7} Al final de esta sección se incluye un ejemplo de hoja de puntuación clínica que se usa para monitorizar la condición clínica de los animales a lo largo del procedimiento.

Resultados y evaluación de la severidad real. Todas las ratas tratadas en la etapa 1 con una dosis inicial de 300 mg/kg presentaron signos clínicos. Estos comprendían letargo, postura encorvada, movimientos descoordinados, piloerección, ptosis palpebral, estertores y/o salivación en los días 1 y 2, en el que una rata mostró postura encorvada y también en los días 6 y 7. No se halló muerta ninguna rata ni fue necesario sacrificarlas, por lo tanto, se requirió una segunda etapa, de acuerdo con las directrices. En la etapa 2, con 3 ratas en una dosis de 2000 mg/kg, se encontró muerta una rata hembra el día 2, que entre los días 1 y 2 ya había mostrado una leve pérdida de peso y signos clínicos tales como letargo, postura encorvada, piloerección, ptosis y salivación. No se hallaron anomalías macroscópicas durante la necropsia de este animal ni otros al final del estudio. No se observó mortalidad en otras ratas. El aumento de peso de las ratas supervivientes fue comparable al de animales no tratados de la misma cepa y edad. A este fin puede utilizarse información anterior acerca de animales no tratados o tratados con el mismo vehículo de la misma cepa y edad. **Evaluación: SEVERA** para la rata hallada muerta, **MODERADA** para las otras ratas.

Sistema de puntuación y ejemplos de hojas de puntuación

La evaluación de la severidad se lleva a cabo mediante una combinación de observaciones clínicas (cambios en el peso, piel, pelaje, ojos y membranas mucosas, aparición de secreciones, y sistema respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y nervioso central, actividad somatomotora y patrones de comportamiento) basadas en un sistema de puntuación clínica que se emplea en toxicología, junto con los resultados de la necropsia. Se registra el momento del aparición, grado y duración de los signos observados. Se asigna a los signos un grado de severidad y el máximo grado se preddefine como 3 ó 4. Los grados se codifican como leve (grado 1), moderado (grado 2), severo (grado 3) y muy severo (grado 4). Para ciertos signos, sólo se registra la presencia (grado 1) o ausencia (grado 0).

Más abajo se incluye una hoja de puntuación clínica. A la izquierda se incluye una amplia, aunque no exhaustiva lista de signos clínicos típicos (la amplitud de la puntuación se indica entre paréntesis para cada uno de los signos, por ejemplo, de 0-3 desde ausente a máxima presencia). Este ejemplo se refiere a una rata que recibió una dosis de 300 mg/kg de peso corporal en la primera etapa con tres ratas.

Signos clínicos	D1-0h	D1-2h	D1-4h	D2	D3	D4	D5	D6	D7 etc. hasta 15
Peso corporal (g)	150	-	-	145	150	152	155	158	
Piel y pelaje: manchas (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piel y pelaje: palidez (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Movimientos clónicos involuntarios (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Movimientos tónicos involuntarios (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temblores (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivación (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lagrimeo (0-1)	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Diarrea (0-1)	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Vocalización (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estereotipia: excesivo acicalamiento (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estereotipia: movimiento repetitivo en círculo (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Comportamiento extraño: automutilación (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema nervioso central: letargo (0-3)	0	2	2	0	0	0	0	0	0
Sistema nervioso central: convulsiones (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Postura: postura encorvada (0-1)	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Postura: postura erguida (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Postura: decúbito ventrolateral (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anormalidades al andar: movimientos descoordinados (0-3)	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Piloerección (0-1)	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Ptosis (párpado cerrado) (0-3)	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Anormalidades respiratorias: respiración trabajosa (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anormalidades respiratorias: estertores (0-3)	0	1	1	0	0	0	0	0	0

A continuación, se incluye otro ejemplo del mismo estudio, esta vez una rata que recibió una dosis de 2000 mg/kg en la segunda etapa junto a otras tres ratas. Esta rata muere en el día 2, después de la observación programada. En la hoja de puntuación clínica sólo se muestran las anomalías durante el periodo de observación.

Signos clínicos	D1-0h	D1-2h	D1-4h	D2	D3	D4	D5	D6	D7 etc. hasta 15
Sistema nervioso central: letargo (0-3)	0	1	1	1	-	-	-	-	-
Postura: postura encorvada (0-1)	1	1	1	1	-	-	-	-	-
Piloerección (0-1)	0	1	1	1					
Ptosis (párpado cerrado) (0-3)	0	2	1	1					
Salivación (0-3)	0	0	0	1					

Referencias

1. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 401: acute oral toxicity. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 1987.
2. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 423: acute oral toxicity – fixed dose procedure. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2001.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 423: acute oral toxicity – acute toxic class method. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2002.
4. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 425: acute oral toxicity – up-and-down procedure. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2008.
5. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance document on acute oral toxicity testing. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2000.
6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD Publishing, 2000.
7. Fentener van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, et al. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab Anim* 2015; 49: 267–283.

Estudio farmacocinético en perros después de una única administración de una sustancia a testar

Contexto general

El objetivo del estudio es estudiar la farmacocinética de un compuesto después de una única administración. Se evaluará la diferencia en la exposición sistémica después de la administración por vía oral (cápsula/pastilla/sonda/dieta), intravenosa, dérmica o subcutánea (bioequivalencia). En sustancias destinadas a la administración por vía oral en humanos, esta se compara con la vía intravenosa, que es la vía de preferencia al permitir un 100% de biodisponibilidad. Las directrices para la prueba del compuesto que se aplican se refieren a cualquier forma de exposición humana, uso prospectivo o legislación.¹⁻¹⁰ El compuesto puede pertenecer a productos farmacéuticos para uso humano o veterinario, ingredientes alimentarios o productos químicos y agrícolas.

Procedimiento ilustrativo

Diseño del estudio. Un diseño de estudio común consiste en usar los mismos animales durante dos periodos. En este ejemplo, se utilizaron tres perros. En el primer periodo, se miden los niveles en plasma del compuesto después de una dosis intravenosa, y después de un periodo de lavado adecuado, en el segundo periodo, se miden los niveles del compuesto en plasma después de administrar dosis orales a los mismos animales. El estudio puede ampliarse a tres o más periodos con los intervalos de lavado adecuados para comparar diferentes formulaciones de la sustancia de prueba por vía oral (por ejemplo, diferentes soluciones, pastillas, cápsulas). Para estudios de bioequivalencia donde un compuesto de prueba se compara con un compuesto conocido, puede usarse un diseño de bloques aleatorios para hacer aleatorio el orden de exposición a las diferentes vías y, por lo tanto, prevenir cualquier tipo de efecto retardado de las dosis previas. Normalmente, esto no será necesario para los estudios de biodisponibilidad, donde se prueba un compuesto desconocido para comprobar si tiene suficiente biodisponibilidad para usarse en futuros estudios. Pueden recolectarse muestras de orina y/o heces de los animales alojándolos en jaulas metabólicas. Después del estudio, todavía puede ser científicamente plausible la reutilización del animal, que puede destinarse a los "animales de reserva". Se decidirá si los animales pueden utilizarse de acuerdo con su edad, evaluación del bienestar durante su vida y durante el procedimiento, recuperación de la salud y el bienestar de acuerdo con la opinión veterinaria y clasificación de los procedimientos futuros. El estudio comprendió un total de cuatro periodos, el primero con una dosis intravenosa seguido de tres periodos con dosis en diferentes cápsulas, todos ellos separados por un intervalo de lavado de una semana. Las observaciones comprendieron signos clínicos y medición de peso corporal antes de cada periodo de dosis.

Consideración de refinamientos específicos y del punto final humanitario

¿Qué implicaciones tiene este estudio para los animales?	¿Qué experimentarán los animales? ¿Cuánto sufrimiento puede causar? ¿Qué puede empeorarlo?	¿Cómo se reducirá el sufrimiento al mínimo?	
	Efectos adversos	Metodología e intervenciones para minimizar la severidad	Punto final
Ayuno en el estudio de dosis oral hasta 20-24 horas previas a recibir la dosis para mejorar la absorción gastrointestinal, para evitar vómito de comida y/o posible bioquímica clínica de las muestras de sangre. O: puede ofrecerse una dieta para la misma absorción	En general, no se considera que sea un procedimiento que cause malestar en perros adultos que rutinariamente son alimentados una vez al día (si normalmente se les alimenta dos veces al día, se consideraría como un procedimiento). Si se exceden las 24 horas de ayuno	Preferiblemente, no más largo de lo fisiológicamente aconsejado (12 horas en perros) y lo científicamente necesario para vaciar el tracto gastrointestinal para mejorar la absorción gastrointestinal de sustancias, pero también para evitar los vómitos o los posibles	Nada que reseñar

gastrointestinal antes o después de la dosis	posterior a la dosis o en animales jóvenes, puede causar malestar. Dependiendo de la duración del ayuno y el efecto de la sustancia a testar puede producir vómitos o efectos gastrointestinales locales: desde ningún efecto hasta sensación de hambre, náusea, indigestión, dolor, vómitos, aspiración de alimento, diarrea debido a efectos gastrointestinales.	efectos locales de la sustancia de prueba. Cambios relacionados con el tiempo de los procedimientos.	
Restricción de agua (normalmente no necesario, pero si se indica, de una duración limitada como 2 horas antes y 2 horas después de la dosis, la cantidad exacta de agua puede administrarse mediante sonda después de administrar la sustancia de prueba)	No se espera malestar ni deshidratación, malestar transitorio LEVE si se emplea una sonda oral para administrar el agua.	Restricción de agua, preferiblemente no más larga de lo fisiológicamente aconsejado y lo científicamente necesario para mejorar/armonizar la absorción gastrointestinal de sustancias. Técnica/equipamiento apropiados, por ejemplo, catéter flexible desechable de un tamaño adecuado para la administración oral del agua.	Nada que reseñar
Dosis única por vía oral (cápsula/pastilla/sonda), subcutánea, intramuscular, intravenosa (venas superficiales), dérmica, sublingual, rectal, vaginal, intratraqueal o intranasal. Algunos diseños de estudio pueden comprender la prueba de metabolitos junto a las sustancias de prueba y/o productos de referencia (boequivalencia) y por lo tanto implicarán dosis <i>repetidas</i> al animal teniendo en consideración los periodos de lavado apropiados.	Malestar transitorio LEVE dependiendo de la vía de administración, inmovilización, posible anestesia (por vía intratraqueal o intranasal) y efectos locales/sistémicos de la sustancia a testar y el vehículo. Aunque se usan dosis no tóxicas, los efectos inesperados pueden llegar a ser de severidad MODERADA. Malestar LEVE a MODERADO debido a dosis repetidas o uso de anestesia durante la administración intratraqueal.	Limitación de los volúmenes administrados . ¹¹ Selección apropiada del vehículo (óptima exposición a la sustancia, biológicamente inerte, sin efectos biológicos y toxicidad/con efectos limitados). Equipamiento de administración adecuado, por ejemplo, catéter flexible desechable de un tamaño adecuado en lugar de una aguja de acero como sonda). Anestesia apropiada. Mezclar con alimentos si esto no obstaculiza la absorción.	Punto final determinado mediante la puntuación clínica total. Los animales que den muestras de signos clínicos severos o que estén moribundos serán sacrificados
Repetida toma de muestras de sangre (por ejemplo, vena yugular) después de una única dosis para toxicocinética (dosis oral: por ejemplo, antes de la dosis, 8 veces en las primeras 24 horas, después 5 veces hasta día 5; dosis intravenosa: por ejemplo, antes de la dosis, 10-12 veces en las primeras 24 horas, después 2 veces hasta el día 3, o hasta 4-5 veces hasta el día 4-5)	(Re)introducción de la aguja sin causar malestar o malestar LEVE dependiendo de la posible aclimatación al procedimiento o posible reacción inflamatoria del tejido local.	Uso de entrenamiento mediante refuerzo positivo antes de llevar a cabo la toma de muestras. Buenas prácticas, equipamiento y técnicas. Volúmenes de muestra apropiados que normalmente no supongan una limitación en esta especie/diseño (volúmenes pequeños frecuentes que probablemente no causarán ninguna perturbación fisiológica). ¹¹ El uso de un catéter permanente puede ser preferible para un periodo de toma de muestras frecuentes	Nada que reseñar

		para mejorar el acceso a las venas y evitar reacciones locales.	
Alojamiento individual en jaula metabólica para la toma de muestras de orina no invasiva mediante la recolección de orina espontánea en uno o dos periodos de 24 horas.	Aislamiento social. La jaula metabólica puede evitar el contacto táctil en un periodo de tiempo limitado, pero el contacto olfativo, visual y auditivo sigue presente. Por debajo del umbral si es un periodo breve (jaula metabólica ≤ 24 horas). Si es mayor de 24 horas, puede ser LEVE.	Promover contacto visual, olfativo, auditivo o contacto táctil limitado (por ejemplo, nariz) con conspecíficos. Socialización humana frecuente (no sólo observaciones/procedimientos si no también tiempo de interacción/juego) o tratamiento/observación (si está basado en la opinión veterinaria). Material de enriquecimiento que no interfiera.	Nada que reseñar

Análisis prospectivo inicial de severidad. Sólo se espera que los animales experimenten malestar LEVE por la falta de alimento/restricción de agua, alojamiento individual, única dosis, y toma de muestras repetidas de sangre. Se espera que los efectos de la sustancia a testar estén ausentes o sean muy limitados debido a los niveles considerados farmacológicos.

Es apropiada una clasificación prospectiva de severidad LEVE.

¿Podría la clasificación de severidad ser MODERADA?

La administración de una única dosis de la sustancia a testar y la toma frecuente de muestras de sangre se considera LEVE basándose en el carácter/comportamiento de la especie (interacción social con humanos), método de inmovilización, y buenas prácticas en lo que se refiere a las técnicas/volúmenes de administración y muestra. Resulta poco probable prospectivamente que la severidad sea MODERADA ya que se usarán dosis farmacológicas y no tóxicas, pero podría causarse por efectos inesperados de la sustancia a testar (o el vehículo) o bien por posibles complicaciones durante la administración y la toma de muestras.

Observaciones clínicas. Los exámenes veterinarios se llevan a cabo antes del inicio del estudio (desde la llegada del animal desde el proveedor o a intervalos periódicos en los animales de reserva) para asegurar el buen estado de salud y decidir si es apropiado (re)utilizar el animal en el procedimiento. Cuando se considere necesario, se llevarán a cabo exámenes veterinarios durante el estudio. Durante el periodo del estudio, se monitorizará a los animales respecto a mortalidad/viabilidad al menos dos veces al día, y en busca de signos clínicos durante el periodo de administración y seguimiento al menos una vez al día.¹²

Este es un ejemplo de hoja de puntuación clínica basado en la observación individual (el rango de puntuación que se aplica está entre paréntesis):

Periodo:	1				2 etc.			
Fecha:	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Peso corporal (en kg o g)								
Piloerección (0-1)								
Letargo (0-3)								
Inquietud (0-3)								
Agresividad (0-3)								
Consumo de alimento (en g)								
Salivación (0-3)								
Vómito (de alimento) (0-1)								
Vómito (de moco) (0-1)								
Taquipnea (0-1)								
Temblor (0-3)								
Postura encorvada (0-1)								

Postura anormal (0-1)
Decúbito ventrolateral (0-1)
Marcha anormal (0-3)
Diarrea (0-1)
Heces con moco (0-1)
Heces con partículas rojas (0-1)
Hipertermia

La evaluación de la severidad se lleva a cabo mediante una combinación de observaciones clínicas generales (peso corporal, apariencia, comportamiento, entorno de la jaula) basadas en un sistema de puntuación clínica usada en toxicología. Se registran el momento de aparición, grado y duración de los signos observados. Se asigna a los signos un grado de severidad y el máximo grado se predefine como 3 ó 4. Los grados se codifican como leve (grado 1), moderado (grado 2), severo (grado 3) y muy severo (grado 4). Para ciertos signos, sólo se registra la presencia (grado 1) o ausencia (grado 0).

Resultados y evaluación de la severidad real. En el primer periodo no hubo mortalidad. En el primer periodo de dosis intravenosa, un animal (número 3 en el ejemplo) mostró signos clínicos como temblor leve/moderado, letargo leve, postura encorvada, vómito de alimento y moco, heces con moco, y/o heces con partículas rojas durante un periodo de 2 horas, seguido de una rápida y completa recuperación. **Evaluación: LEVE.**

Los leves, pero claros signos clínicos de relativamente corta duración después de la dosis intravenosa podrían indicar signos similares durante un periodo de tiempo más largo después de la dosis oral. Por lo tanto, la evaluación prospectiva para los periodos de dosis oral se aumentó a MODERADA. Antes de continuar con el estudio, la autoridad competente fue informada del aumento de la severidad en la evaluación prospectiva.

En el segundo periodo (dosis oral), los animales no mostraron signos clínicos. **Evaluación: LEVE.** En el tercer y cuarto periodo (dosis oral con diferentes cápsulas), un animal mostró hipertermia, vómito de alimento, postura encorvada y postura y marcha anormales, decúbito ventrolateral, contracción muscular, temblor y letargo, salivación y taquipnea, seguidos de recuperación al final del día. **Evaluación: MODERADA.**

Ejemplos de hojas de puntuación clínica

Las puntuaciones clínicas para cada animal durante los periodos de dosis son una selección de signos observados en este ejemplo de estudio y sólo parte de una lista completa de signos clínicos de los que se dispone con su correspondiente puntuación.

Ejemplo de puntuación clínica en animal 1

Periodo:	1				2				3				4			
Fecha:	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Peso corporal (kg)	9,9	-	-	-	9,9	-	-	-	9,9	-	-	-	10	-	-	-
Vómito (de alimento) (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-
Temblor (0-3)	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	-
Heces con moco (0-1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-

Ejemplo de puntuación clínica en animal 3

Periodo:	1				2				3				4			
Fecha:	D1	D2	D3	D4												
Peso corporal (en kg o g)	10,7	-	-	-	10,5	-	-	-	10,6	-	-	-	10,6	-	-	-
En celo (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

Ejemplo de puntuación clínica en animal 3

Periodo:	1				2				3				4			
Fecha:	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Peso corporal (en kg o g)	10,3	-	-	-	10,0	-	-	-	10,0	-	-	-	9,9	-	-	-
Letargo (0-3)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-

Salivación (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	-
Vómito (de alimento) (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Vómito (de moco) (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Taquipnea (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Temblor (0-3)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0
Contracción muscular (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Postura encorvada (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Postura anormal (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Decúbito ventrolateral (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Marcha anormal (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Heces con moco (0-1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heces con partículas rojas (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipertermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

Evaluación de la severidad real en los tres ejemplos

Acumulada a lo largo de los cuatro periodos de dosis, durante la evaluación de la severidad real, se consideró **LEVE** para dos animales; para un animal se consideró **MODERADA** a lo largo de los cuatro periodos de dosis.

Acciones

Ya que los signos clínicos suelen detectarse justo después (IV) y/o durante el primer día después de la dosis (vía oral), puede ser esencial una atenta monitorización en el caso de la aparición de efectos adversos moderados o severos inesperados, apoyados en el consejo veterinario si hace falta, la notificación a la autoridad competente antes de continuar y por cualquier tipo de intervención, como la eutanasia en el caso del punto final.¹³ Si se detectan efectos adversos de moderados a severos en el primer animal, se considera una buena práctica un inicio escalonado (intervalo de tiempo entre el primer y el segundo animal, con consideración de la duración esperada de los posibles signos clínicos) y la reconsideración de la dosis. También deben considerarse antes del estudio las posibles diferencias entre sexos o, en caso de desconocerse, en el diseño del estudio (por ejemplo, empezar por un animal de cada sexo, después seguir con animales del mismo sexo).

Después de la última dosis y del periodo de observación, en caso de efectos leves a moderados, se liberarán a los perros del estudio y se les monitoriza en la reserva hasta que dejen de observarse anomalías. En el caso de que se planee su reutilización, debería demostrarse que el estado de salud general y bienestar del animal se han restaurado completamente antes de que se considere su uso para cualquier otro posible estudio. Esta evaluación deberá estar de acuerdo con la opinión veterinaria y preferiblemente reforzada por exámenes periódicos clínicos y de laboratorio. En caso necesario, basado en estos hallazgos y en datos de los bioanálisis del estudio (determinado por un tiempo de eliminación al 50%), debería considerarse un periodo de lavado entre los estudios venideros.

Referencias

1. European Medicines Agency. *Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species*. Report no. EMEA/CVMP/133/99, September 2000. London: European Medicines Agency.
2. European Community (EC). *Annex of the EEC Directive 75/318/EEC, Part 3, section II.G, as amended with a view to the granting of a marketing authorisation for a medicinal product, 3BS11a: "pharmacokinetics and metabolic studies in the safety evaluation of new medicinal products in animals"*.
3. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). *Health effects test guidelines: metabolism and pharmacokinetics*. Paragraph 870.7485, August 1998. Washington, DC: EPA.

4. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). *Health effects test guidelines: dermal penetration*. Paragraph 870.7600, August 1998. Washington, DC: EPA.
5. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). *Residue chemistry test guidelines: nature of the residue – plants, livestock*. Paragraph 860.1300, August 1996. Washington, DC: EPA.
6. ICH Secretariat. *Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies*. ICH S3A, October 1994. Geneva: ICH Secretariat.
7. ICH Secretariat. *Pharmacokinetics: guidance for repeated dose tissue distribution studies*. ICH S3B, October 1994. Geneva: ICH Secretariat.
8. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 417: toxicokinetics. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2010.
9. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 427: percutaneous absorption: in vivo method. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2004.
10. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 503: metabolism in livestock. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 5: other test guidelines*. Paris: OECD Publishing, 2007.
11. Diehl HK, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 15–23.
12. Fentener van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, et al. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab Anim* 2015; 49: 267–283.
13. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD Publishing, 2000.