

# La tercera R: Refinamiento

## Protocolos de supervisión en experimentación animal



 Cuadernos



# **La tercera R: Refinamiento**

Protocolos de supervisión  
en experimentación animal



# La tercera R: Refinamiento

## Protocolos de supervisión en experimentación animal

Documento de recomendaciones

Comité de Ética en Experimentación Animal  
(CEEA - UPV/EHU)

Elaborado por  
ALMUDENA RAMOS, GARIKOITZ AZKONA y SUSI MARCOS  
y revisado por GLORIA LETE

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Leioa, abril 2022

**Cuadernos CEID**

Vicerrectorado de Investigación

Coordinadora: M.<sup>a</sup> Jesús Marcos Muñoz

[ceid@ehu.eus](mailto:ceid@ehu.eus)

© Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco UPV/EHU

# Índice

Presentación . . . . .	9
Acrónimos . . . . .	11
Glosario . . . . .	13
<b>1. La tercera R: Refinamiento. . . . .</b>	<b>15</b>
1.1. Responsable del refinamiento. . . . .	16
1.2. Cómo se hace el refinamiento . . . . .	17
<b>2. Bienestar animal . . . . .</b>	<b>19</b>
2.1. Selección de indicadores de bienestar apropiados . . . . .	20
2.2. Registro de indicadores de bienestar animal. . . . .	23
2.3. Temporalización, duración y frecuencia de la evaluación . . . . .	25
2.4. Recomendaciones para la evaluación del bienestar . . . . .	27
2.5. Criterios de punto final humanitario. . . . .	29
<b>Ejemplos de protocolos . . . . .</b>	<b>31</b>
Ejemplo de protocolo de supervisión general . . . . .	33
Ejemplo de protocolo de supervisión en estudios de oncología . . . . .	35
Ejemplo de protocolo de supervisión en estudios de isquemia cerebral. . . . .	37



## Presentación

El Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, en su artículo 1, describe como objeto del mismo, «el reemplazo y reducción de la utilización de animales en procedimientos y el refinamiento de la cría, el alojamiento, los cuidados y la utilización de animales en tales procedimientos». Y como finalidad que «el número de animales utilizados en los procedimientos se reduzca al mínimo, aplicando en lo posible métodos alternativos, que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero, que se evite toda duplicación inútil de procedimientos, y que a los animales utilizados, criados o suministrados se les concedan los cuidados adecuados». Todo ello bajo el amparo de las denominadas 3 erres (3Rs) en la experimentación animal: reemplazo, reducción y refinamiento.

Aunque existe un mayor consenso respecto a los principios de remplazo y reducción, es en la aplicación del principio de refinamiento donde ha surgido la mayor controversia. El refinamiento es un proceso continuo que requiere la implicación de todas las personas involucradas en el uso de animales de experimentación. El éxito del refinamiento depende de la capacidad de evaluar el dolor o sufrimiento del animal, para poder aliviarlo.

El presente documento tiene como objetivo ayudar a la comunidad universitaria a elaborar **protocolos de supervisión** para el control del estado de bienestar de los animales de experimentación en cada actividad de investigación que se desarrolle. Los protocolos de supervisión nos permiten refinar las técnicas experimentales, reduciendo el sufrimiento y/o angustia de los animales y aumentando su bienestar.

Mediante estos protocolos los investigadores deben ser capaces de detectar cualquier signo de sufrimiento o angustia, y aplicar las medidas correctoras necesarias para eliminarlo o, si no es posible, reducirlo al máximo. Cada protocolo de supervisión lo elabora el grupo de investigación y es evaluado por el CEEA antes de comenzar la experimentación. Debe describir los aspectos físicos y conductuales que se van a supervisar, y para cada uno de ellos una escala de la severidad. Se deben describir también las medidas correctoras y los criterios de punto final.

## Acrónimos

- CEEA** Comité de Ética en Experimentación Animal.
- 3Rs** tres erres: reemplazo, reducción y refinamiento.
- GTE** Grupo de trabajo de expertos de la Comisión Europea.
- JWGR de la BVAWF** Grupo de trabajo Británico sobre Refinamiento de la British Veterinary Association Animal Welfare Foundation.



## Glosario

**Refinamiento.** Utilización de sistemas que permitan disminuir la severidad del daño infligido a los animales, así como aliviar o reducir el posible dolor o malestar que vayan a padecer.

**Bienestar animal.** Estado físico y mental de un animal en relación con las condiciones en las que vive y muere. Incluye las cinco libertades: libre de hambre, de sed y de desnutrición; de temor y de angustia; de molestias físicas y térmicas; de dolor, de lesión y de enfermedad; y de manifestar un comportamiento natural.

**Especie animal.** Grupo de organismos que pueden reproducirse y producir descendencia fértil.

**Indicador de bienestar.** Registros que se miden en el animal para valorar su estado anímico y físico. Se pueden dividir en indicadores «basados en el ambiente» y en indicadores «basados en el animal». Los indicadores «basados en el ambiente» son variables que se miden en el entorno; instalaciones, provisión de agua o el enriquecimiento ambiental. Los indicadores «basados en el animal» incluyen todas aquellas variables que son medidas directamente en los animales; cambios en el comportamiento, la apariencia física, la salud y los parámetros fisiológicos.

**Intervención.** Cualquier acción que se realice al animal para obtener el efecto que se busca. Por ejemplo, cirugía, administración de una sustancia, de analgesia o de anestesia.

**Efecto buscado.** Efecto que se busca en el animal con la intervención realizada, como la extracción del bazo, o la anestesia del animal para una cirugía.

**Efectos colaterales, secundarios o reacciones adversas.** Cualquier efecto, diferente del buscado, que pueda provocar que el animal experimente dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja.

**Medida correctora.** Cualquier medida destinada a paliar el sufrimiento del animal o los efectos colaterales que se apliquen sin interferir en el efecto buscado.

## 1. La tercera R: Refinamiento

¿Por qué es necesario refinar? Y ¿por qué hay que procurar utilizar sistemas que permitan disminuir la severidad del daño producido en los animales de experimentación, o eliminar el dolor o malestar que pudieran padecer durante la experimentación?

Los animales de experimentación pueden sufrir angustia o dolor debido a un mal manejo, ciertas técnicas de manipulación, métodos de eutanasia ineficaces o como consecuencia inevitable del procedimiento empleado. La persona responsable de la actividad de investigación debe valorar el nivel de severidad de cada intervención en función de la siguiente escala (para más información ver Anexo IX del RD 53/2013):

- **Sin recuperación:** las intervenciones se realizan enteramente bajo anestesia general tras la cual el animal no recuperará la conciencia.
- **Leve:** intervenciones, a consecuencia de las cuales es probable que, el animal experimente dolor, sufrimiento o angustia leve de corta duración, sin alteración significativa del bienestar o del estado general.
- **Moderada:** Intervenciones a consecuencia de las cuales es probable que el animal experimente dolor, sufrimiento o angustia moderados de corta duración, o leves pero duraderos, así como intervenciones que pudieran causar una alteración moderada del bienestar o del estado general de los animales.
- **Severa:** intervenciones a consecuencia de las cuales es probable que el animal experimente sufrimiento o angustia intensos o moderados pero duraderos, así como intervenciones que pudieran causar una alteración grave del bienestar o del estado general del animal.

Son tres las razones fundamentales por las que se deben aplicar todos los medios a nuestro alcance para refinar nuestros procedimientos experimentales, con el fin de minimizar el dolor, sufrimiento o angustia de los animales, incluido su sacrificio:

1. Científica: Reducir el sufrimiento y/o angustia de los animales mediante técnicas de refinamiento es un componente importante de las buenas prácticas científicas. Un factor a tener siempre en cuenta es nuestra interacción con los animales. Se ha demostrado que un buen manejo mejora el bienestar de los animales, la recogida de datos y la reproducibilidad.
2. Legislativa: El RD 53/2013 exige que todo proyecto de investigación que utilice animales de experimentación debe ser autorizado por el órgano habilitado (UPV/EHU) y el órgano competente (las diputaciones forales). Para obtener esta autorización, sin la que no puede comenzar la actividad investigadora, es imprescindible describir cómo se cumple el principio de las 3Rs, y describir el protocolo de supervisión y los criterios de punto final.
3. Ética: los animales como seres sintientes pueden experimentar angustia o dolor, por lo que las decisiones morales de aquellas personas que trabajan con animales de experimentación deben estar basadas en minimizar al máximo el dolor y la angustia de los animales.

El equipo de investigación debe elaborar un protocolo sobre cómo realizará la supervisión del animal, y definir los parámetros a supervisar, indicando en qué momento del procedimiento comenzará la supervisión, su duración y frecuencia, el grado de severidad, las medidas correctoras que se tomarán si hubiera cualquier alteración en el bienestar animal (p.ej. la administración de analgesia) y los criterios de punto final humanitario (eutanasia).

### **1.1. Responsable del refinamiento**

Todas las personas que trabajen con animales de experimentación son responsables del refinamiento. Es importante detectar cualquier

signo de sufrimiento del animal lo antes posible para aplicar las medidas correctoras o el punto final humanitario. Es, por tanto, necesario que los investigadores estén familiarizados con la especie animal con la que estén trabajando.

## 1.2. Cómo se hace el refinamiento

El **protocolo de supervisión** es una herramienta muy útil para el refinamiento durante la fase experimental. El diseño del mismo lo debe realizar el investigador principal junto a su equipo. En el diseño se tendrán en cuenta la especie animal y las intervenciones a las que se someterá al animal.

La Comisión Europea creó un grupo de trabajo de expertos (GTE) a fin de evaluar la severidad de los procedimientos experimentales para facilitar la aplicación de la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos y estableció los siguientes requisitos para la evaluación de la severidad unos principios generales:

- Un **enfoque de equipo** es altamente efectivo, ya que permite recibir aportaciones de diferentes personas con diferentes experiencias, prioridades y responsabilidades. Se tendrá en cuenta a los integrantes del equipo investigador en contacto con los animales, al personal del animalario, y al investigador responsable que es quien ha diseñado el proyecto y decide las acciones a realizar.
- Una **formación inicial y continuada** adecuadas para todo el personal participante.
- Una **correcta planificación** del trabajo de cada uno de los integrantes del equipo investigador y del personal técnico del animalario.
- **Indicadores de bienestar adecuados** adaptados a la especie, la cepa y el proyecto, que incluyan observaciones fundamentadas y estructuradas de los animales a intervalos adecuados (por ejemplo, una mayor frecuencia de supervisión durante y después de los procedimientos).
- **Conocimiento de la severidad** de cada procedimiento y de las medidas que deben tomarse si se alcanza o supera dicha seve-

ridad. Un enfoque coherente de las evaluaciones generales sobre el sufrimiento real (sin recuperación/leve/moderado/severo) en los informes estadísticos.

- **Análisis** de las observaciones para emitir un juicio fundamentado sobre la naturaleza y el nivel de sufrimiento.
- **Reflexión** sobre la efectividad con que se aplicaron las 3Rs, y sobre si podrían hacerse mejoras en estudios futuros.

En este documento se establece la fase de diseño experimental como el momento en el que se inicia el proceso para asegurar que se reduce al mínimo la severidad durante la realización de los procedimientos científicos, al examinar si es o no necesario, y si está o no justificado utilizar animales para alcanzar los objetivos científicos planteados. Cuando es necesario y está justificado el uso de animales, es importante asegurarse de que se ha elegido el modelo apropiado y que el diseño del estudio sea robusto. Deberían identificarse todos los aspectos de la actividad de investigación que puedan causar dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero, y se debería plantear cómo puede reducirse al mínimo los efectos, por ejemplo, consultando bibliografía, a otros investigadores, técnicos, veterinario y, en su caso, al órgano encargado del bienestar de los animales.

Se recomienda que la asignación en la clasificación prospectiva de la severidad de los procedimientos esté basada en la severidad más alta prevista para cualquier animal del estudio. Debería, además, elaborarse un plan para observar a los animales que sea adecuado y adaptado al estudio.

Es importante el empleo de una terminología estandarizada que puedan entender todos los que participan en el estudio, lo que mejorará la coherencia en los informes y su interpretación.

Es imprescindible contar con personal suficientemente capacitado y competente para realizar el estudio y encargarse del seguimiento y cuidado de los animales.

## 2. Bienestar animal

Broom (1986) lo definió como el estado del animal en relación con sus intentos de afrontar la situación en la que se encuentra, y la asociación Farm Animal Welfare Council (1979), como el estado físico y mental de un animal en relación con las condiciones en las que vive y muere. He indicó las cinco libertades:

1. Libre de hambre, de sed y de desnutrición.
2. Libre de temor y de angustia.
3. Libre de molestias físicas y térmicas.
4. Libre de dolor, de lesión y de enfermedad.
5. Libre para manifestar un comportamiento natural.

Por desgracia, la experimentación animal afecta directamente a cada uno de ellos. Por eso, un reto importante de la investigación biomédica es intentar reducir la tensión entre el beneficio potencial de los resultados científicos y el bienestar de los animales utilizados.

Un punto de referencia útil para el refinamiento puede ser precisar un nivel de bienestar «ideal» hipotético en nuestro protocolo de supervisión. Este puede definirse como el estado en el que se encuentran los animales cuando sus necesidades nutricionales, ambientales, mentales, físicas y de comportamiento están satisfechas. Son tres los componentes claves para este estado ideal: el estado físico, el estado bioquímico/fisiológico y el estado psicológico. Para cada uno de estos componentes se pueden establecer unas características que definan la idoneidad del mismo y que se objetiven en una serie de indicadores de bienestar.

Componente	Características	Indicadores
Físico.	Buen nivel fisiológico. Ausencia de discapacidad física, dolor, malestar o impotencia funcional.	Peso corporal. Estado del pelaje. Capacidad motriz.
Fisiológico/Bioquímico.	Niveles de estrés y sufrimiento que no exceden los de la interacción social.	Frecuencia cardíaca y respiratoria. Niveles de corticosterona.
Psicológico.	Comportamiento «apropiado» a su especie.	Cambios en el comportamiento. Aumento de agresividad. Aislamiento.

Puede asumirse que se da este estado ideal cuando las condiciones de alojamiento y cuidados son acordes a las buenas prácticas de manejo, los animales están sanos y están completamente habituados a sus rutinas de alojamiento y cría. En tal situación, cualquier desviación de este estado ideal podría indicar un problema de bienestar y debería tratarse como tal.

Debe tenerse en cuenta, que algunos parámetros fisiológicos pueden alterarse por estímulos positivos, como el juego, y que algunas especies, que suelen ser presa (roedores), suelen ocultar cualquier signo comportamental de sufrimiento. Por todo esto, la selección e interpretación de los indicadores de bienestar debe ser muy rigurosa.

## 2.1. Selección de indicadores de bienestar apropiados

A la hora de definir los aspectos a supervisar para evaluar el bienestar animal, es importante tener en cuenta la especie animal, y en alguna especie incluso la cepa. La selección de los indicadores de bienestar es clave y deben ser:

- Reconocibles de forma rápida y fiable.
- Efectivos a la hora de proporcionar buenas medidas del bienestar.
- Relevantes para el proyecto y la especie.
- De aplicación práctica y que no perturben al animal.
- Acordes al diseño experimental.
- Congruentes en la medición, interpretación y análisis.

Distinguiamos tres tipos de indicadores:

### a) ***Indicadores generales***

Indicadores que pueden medirse de forma directa y objetiva. Proporcionan indicios de que el bienestar animal pueda estar comprometido y son útiles para definir e implementar los criterios de punto final humanitario. Entre ellos: «peso» y «condición corporal» (estado físico), «temperatura corporal medida» (estado fisiológico) y «consumo de agua y alimento» (podría entrar en cualquiera de las tres categorías).

### b) ***Indicadores específicos***

El siguiente paso es predecir los posibles efectos adversos, de forma que se puede crear una lista de indicadores a la medida del estudio. La lista de efectos adversos potenciales puede incluir elementos tales como molestias o dolor en determinadas partes del cuerpo, comportamientos tipo ansiosos, capacidades físicas reducidas, etc. A continuación, se debe considerar cuáles pueden ser los indicadores fisiológicos o de comportamiento para estos efectos adversos. Algunos indicadores de uso común, que ya están asociados con diversos efectos adversos, son: curvar el lomo, retorcerse o encoger el costado en roedores, expresiones faciales en ratón, flaccidez muscular en torno al ojo en aves, cambio de color de piel de la piel en peces o renuencia a moverse en muchas especies.

El objetivo es incluir el menor número de parámetros necesario para detectar rápidamente y de forma efectiva los efectos adversos.

Podría reducirse el número de indicadores usando los llamados «indicadores iceberg», que resumen otras áreas del bienestar y son fáciles de comprender. Uno de estos indicadores es la ausencia de acicalado después de la cirugía, lo que podría indicar una incapacidad para coordinar movimientos de acicalado, dolor postoperatorio o, en caso de ser poco después de la cirugía, los efectos secundarios de agentes anestésicos o analgésicos.

Es esencial que se establezcan para cada proyecto puntos de intervención claros, de forma que se definan intervenciones adecuadas en caso de la aparición de signos clave. Por ejemplo, la fluidoterapia podría iniciarse tan pronto como aparezcan signos de deshidratación, o en caso de pérdida del 10% de peso corporal en ratas se podría proporcionar una mezcla húmeda dentro de la cubeta.

Deberían establecerse umbrales que permitan el mínimo nivel de sufrimiento animal, al tiempo que contribuyan al objetivo del estudio. En esta etapa se definen los criterios de punto final humanitario, alcanzados los cuales el animal se retirará temporal o permanentemente del estudio.

### **c) *Indicadores de bienestar positivo***

La evaluación del bienestar generalmente se centra en el bienestar negativo más que en el positivo. Sin embargo, también es deseable mejorar la calidad de vida del animal, así como minimizar su sufrimiento, por lo que debería considerarse la utilidad y definir signos del bienestar positivo y la incorporación de los mismos al sistema de evaluación del bienestar. Podemos entender como signos positivos del bienestar animal, los buenos cuidados, incluyendo el acicalado, los niveles normales de actividad, empleo del sueño, incluyendo patrones de sueño, la búsqueda de interacción con los humanos, la curiosidad de interés por la exploración, la interacción social apropiada con otros miembros de la especie, incluyendo acicalarse unos a otros, el apareamiento, el comportamiento «anticipatorio», el uso de elementos de la jaula, el interés por la comida, los juegos, la vocalización asociada con el bienestar positivo, el aprendizaje y funciones cognitivas normales.

## 2.2. Registro de indicadores de bienestar animal

El registro de los indicadores de bienestar animal se realiza mediante **protocolos de supervisión**. Este comité recomienda el uso de hojas de evaluación con listas de indicadores predeterminadas mediante una evaluación numérica.

Es de vital importancia el uso en un lenguaje estandarizado para describir la apariencia y comportamiento de los animales, de forma que concuerde tanto dentro del equipo de evaluación del bienestar de una actividad de investigación, como entre diferentes centros que estén realizando evaluación del bienestar.

El grupo de trabajo designado por la Comisión Europea para la evaluación de la severidad en los procedimientos, propone los siguientes indicadores de bienestar animal:

### 1. Estado general

- a) Peso corporal (disminución del 5, 10, 15, 20%).
- b) Piel y pelaje (piloerección, pérdida de pelo, deshidratación, falta de acicalamiento, lesiones cutáneas, manchas de heces o de orina).
- c) Secreciones (ocular, nasal, urogenital, porfirina).
- d) Ojos (hundidos, cerrados o semicerrados, lesiones).
- e) Boca (salivación, maloclusión).
- f) Otros (gestos de dolor, abdomen distendido).

### 2. Funciones corporales

- a) Respiración (bradipnea, disnea, jadeo, taquipnea).
- b) Ingesta de agua y comida (aumentada o disminuida).
- c) Temperatura corporal (aumentada o disminuida).
- d) Sentidos (deterioro vista, oído o equilibrio).

### 3. Ambiente

- a) Entorno (cama, material de enriquecimiento, material para nido).
- b) Presencia y consistencia de las heces, lecho húmedo por poliuria, presencia de vómito o sangre.

#### 4. **Comportamiento**

- a) Interacción social (interacciones agresivas, ansiedad).
- b) Comportamientos no deseados (estereotipias, arranque de pelaje).
- c) Postura y movilidad (postura anormal, cojera, letargia, descoordinación, encorvamiento, cabeza caída).
- d) Otros (temblores, convulsiones, vocalizaciones).

#### 5. **Indicadores específicos del procedimiento (efectos adversos)**

- a) Cirugía.
- b) Oncología.
- c) Modelos de infección.
- d) Animales genéticamente modificados (OMG).
- e) Neurológicos.
- f) Metabólicos.

Cada indicador se evalúa y se le da una puntuación de acuerdo con su severidad aparente. Por ejemplo, no afectado se marcaría «0» y una leve desviación de la normalidad, podría marcarse como «1». Sin embargo, una desviación moderada de la normalidad se marca con «2», e implica la administración de analgesia (medida correctora) y un aumento en la frecuencia de supervisión. Una desviación significativa se marca con «3», e implica el sacrificio del animal y el cese del procedimiento.

Posteriormente las puntuaciones se suman y los resultados determinan la severidad del procedimiento y si se requiere una medida correctora o se ha alcanzado el punto final. Generalmente se sigue el siguiente criterio:

- Inferior al 25% del máximo de puntuación: Leve. Supervisión semanal.
- Entre 25% y 50% del máximo de puntuación: Moderado. Supervisión diaria. Posible existencia de dolor o angustia. Hay que plantearse el uso de analgésicos o cualquier otra medida correctora.
- Más del 50% del máximo de la puntuación: Severo. Sacrificio del animal.

### 2.3. Temporalización, duración y frecuencia de la evaluación

Tras el diseño del protocolo de supervisión, debe establecerse un protocolo de evaluación que incluya la frecuencia, el momento y la duración de la misma. Evidentemente, cuantos más animales conformen el grupo experimental, más tiempo requerirá esta evaluación, dado que debe realizarse de forma individual, por lo que se deben prever los recursos humanos necesarios para realizarla.

Según establece el Grupo de Trabajo Británico sobre Refinamiento de la British Veterinary Association Animal Welfare Foundation (JWGR de la BVA/AFW), los principales factores a tener en cuenta para planificar y realizar la evaluación del bienestar animal son los siguientes:

#### a) *Especie*

La evaluación del bienestar presenta una complejidad variable en función de la especie con la que se trabaja. Algunas especies presentan comportamientos más fáciles de detectar e interpretar. Un primate deprimido muestra una postura característica que es fácil de reconocer y con la que es fácil empatizar para la mayoría de los observadores, mientras que los signos de un déficit en el bienestar pueden ser más difíciles de reconocer en especies tales como roedores y no mamíferos. Además, es probable que haya diferencias entre cepas, en comportamiento normal y respuesta al dolor, sufrimiento o angustia.

Por otro lado, en lo que respecta a los organismos modificados genéticamente (OMG), muchas modificaciones genéticas han dado lugar a características predecibles e impredecibles que afectan al bienestar y que no siempre serán detectadas usando los protocolos fenotípicos estándar. El bienestar de estos animales debería evaluarse cuidadosamente durante un periodo prolongado que comience en el periodo neonatal de forma que se pueda identificar cualquier efecto adverso y que se identifiquen los indicadores apropiados para la evaluación del bienestar de dicha cepa.

## **b) *Diseño experimental***

El diseño experimental también es un factor clave para establecer la frecuencia y duración de la evaluación del bienestar animal, los procedimientos severos precisarán una monitorización más frecuente, así como aquellos en los que los efectos adversos se establecen con rapidez. Así mismo, existen periodos críticos de la experimentación en los que la evaluación del bienestar animal debe intensificarse, como también debe aumentarse el tiempo que se invierte en la misma, para poder observar algunos signos de sufrimiento específicos tales como el «twitching» (rápidos movimientos de pelaje del lomo), arquear el lomo, retorcerse, etc. que se pueden observar en el periodo postoperatorio inmediato en ratas a las que se les ha realizado diversos tipos de cirugía abdominal, y que pueden mantenerse hasta las 24 horas posteriores a la cirugía. Las observaciones deben intensificarse para comprobar el efecto de la pauta analgésica y espaciarse en el caso de que no hubiera complicaciones.

## **c) *Entorno***

La evaluación del bienestar debería tener en cuenta la presencia o no de material de enriquecimiento ambiental (material para la construcción de nidos, refugios, etc.) porque podrían dificultar la observación de los animales.

## **d) *Procedimientos de cría***

Aquellas tareas, tales como el cambio periódico de jaulas, deben tenerse en cuenta al establecer el momento de la evaluación del bienestar animal. Después de la limpieza de las jaulas en el caso de las ratas, se ven incrementados tanto los comportamientos exploratorios y el uso de refugios, como el ritmo circadiano y la presión sanguínea. Estos parámetros fisiológicos y de comportamiento pueden tardar hasta 2 horas en volver a los niveles previos a la manipulación, por lo que debe ser tenido en cuenta al establecer la temporalidad de la evaluación.

### e) *Ritmo circadiano de los animales*

Es preferible evaluar a los animales durante su periodo activo, evaluar a los animales despiertos reduce la posibilidad de pasar por alto signos importantes.

Es necesario tener en cuenta que el periodo activo en la mayoría de los roedores es el periodo nocturno, por lo que existen evidentes dificultades de recursos humanos para llevar a cabo dicha evaluación. Existen diversas opciones para salvar o reducir este problema, como la de albergar a los animales en entornos con ciclos de luz invertidos o, emplear las interrupciones en el ritmo circadiano como indicadores de bienestar. Por ejemplo, en el periodo diurno se espera que los roedores no muestren un grado importante de actividad, mientras que sí deberían hacerlo en el periodo nocturno, por lo que los cambios en estos patrones de actividad deberían ser registrados como alteraciones en la conducta. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los animales de experimentación, aunque sean especies nocturnas, están habituados a un cierto nivel de actividad derivado de las rutinas de trabajo que se desarrollan en el animalario en el que se alojan, sin que esta actividad suponga ningún menoscabo de su nivel de bienestar.

## 2.4. **Recomendaciones para la evaluación del bienestar**

Es recomendable que la tarea de evaluación del bienestar animal sea realizada por un número reducido de personas, que favorecerá la homogeneidad, tanto de las observaciones registradas, como de la respuesta de los animales, que pueden detectar el cambio de persona.

### a) *Evaluación a distancia*

Con frecuencia, la evaluación de aspectos como la apariencia general, postura y comportamiento espontáneo se puede realizar a una cierta distancia sin abrir la jaula. Esto permite detectar comportamientos no provocados como indicadores de malestar, tales como animales aislados de sus compañeros. El juego, buscar comida o acicalarse son indicadores positivos del bienestar.

También debe observarse el alojamiento para detectar problemas como sangrado, vómitos o anomalías en las heces.

Otros indicadores que pueden ser observados a distancia son piloerección, cambios de postura, alteraciones en la frecuencia opercular en peces, movilidad reducida o especial atención a la herida quirúrgica. Estos signos pueden ser específicos del proyecto, y por lo tanto registrados en el lugar correspondiente en la hoja de evaluación, o inesperados, y entonces deberían registrarse en el apartado para texto libre, pero siempre deben quedar registrados.

### **b) *Apertura de la cubeta o jaula***

La apertura permite examinar el recinto con más detalle, así como las reacciones del animal a la presencia del observador. La mayoría de las especies responderán con un inicial aumento de la actividad, seguido de estabilización.

### **c) *Manipulación de los animales***

La manipulación individual de los animales se utiliza para medir criterios generales como el peso o la temperatura, así como para evaluar indicadores específicos, tales como la inflamación de la piel, zonas sensibles, medición de tumores, toma de muestras, etc. La manipulación suele ser estresante para los animales, lo que puede afectar tanto al bienestar animal como a los datos científicos. La observación después de la manipulación puede facilitar la detección de signos relevantes como los mencionados anteriormente respecto al periodo postoperatorio y puede acortar el tiempo de evaluación.

No siempre es apropiado manipular a los animales, ya que se puede causar malestar o dolor en los momentos posteriores a un procedimiento, o en el caso de algunas especies acuáticas o en hembras que estén criando. En estos casos, es preferible evitar la manipulación y realizar una inspección visual cuidadosa.

#### **d) *Problemas de bienestar***

Cuando se detecte un problema de bienestar, la acción que se realice debe estar prevista y ser conocida por todos los actores (equipo investigador y técnicos del animalario). Se establecerá un sistema que identifique claramente la jaula o recinto donde se alojen los animales que sean causa de preocupación, y que requieran de una monitorización adicional.

#### **e) *Análisis de los registros de bienestar***

Los registros tomados durante el proyecto deben ser revisados durante la ejecución y una vez finalizado el mismo, con el fin de asegurar que la evaluación del bienestar animal está funcionando, detectar posibles nuevos efectos adversos que no se hubieran previsto, y asegurar que cualquier nueva aportación que afecte a la naturaleza del proyecto, al comportamiento del animal o a las técnicas de evaluación se tendrán en cuenta.

### **2.5. Criterios de punto final humanitario**

Los criterios de punto final humanitario son parámetros de la salud del animal que, de forma aislada o combinada, nos indican que el animal debe retirarse del experimento. Son fundamentales a la hora de reducir el impacto negativo que pueden tener los procedimientos experimentales sobre los animales.

Entre las razones para establecer criterios de punto final se encuentran (Morton, 1999):

- El animal no proporciona más información útil, porque su estado —fisiológico o psicológico— no permite obtener datos experimentales fiables. Es inmoral, cruel e inútil mantener a un animal en un experimento si su estado no va a permitir obtener datos de calidad.
- El sufrimiento del animal es mayor de lo previsto, y supera los beneficios que pretendemos obtener con nuestro trabajo; o bien

el sufrimiento del animal es demasiado elevado, independientemente de los beneficios que se esperan de nuestro trabajo.

- No hay necesidad de continuar el experimento porque podemos predecir el trascurso del mismo: son los «criterios de punto final sustitutivo» (surrogate endpoints). Se utilizan sobre todo en protocolos donde se puede producir un deterioro importante de la salud del animal.

Desde el CEEA se recomienda que los investigadores se den de alta y consulten la siguiente página web: <https://www.humane-endpoints.info/es>. Aún y todo, siempre se tendrá en cuenta que un animal comatoso o con automutilaciones o una pérdida de peso superior al 20% desde el comienzo del experimento será considerado que ha alcanzado el punto final independientemente de la puntuación total alcanzada en el protocolo de supervisión.

## Ejemplos de protocolos



# Ejemplo de protocolo de supervisión general

## 1. Pérdida de peso (en una semana)

- 0. Peso normal.
- 1. < 10%.
- 2. Entre un 10 y un 19%.
- 3. > 20% (eutanasia).

## 2. Aspecto general

- 0. Normal.
- 1. Pelaje en mal estado.
- 2. Pelaje en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales.
- 3. Postura anormal.

## 3. Comportamiento

- 0. Normal.
- 1. Pequeños cambios.
- 2. Inactividad.
- 3. Automutilación, vocalizaciones anormales, animales muy inquietos o inmóviles (eutanasia).

## 4. Comportamiento en respuesta a la manipulación

- 0. Normal.
- 1. Pequeños cambios.
- 2. Cambios moderados.
- 3. Animales agresivos o comatosos (eutanasia).

## **Medidas correctoras**

De 0-3: Normal. Supervisión una vez por semana.

De 4-8: Supervisión diaria. Posible existencia de dolor o angustia. Uso de analgésicos y/o antiinflamatorios.

De 9-12: Eutanasia.

## Ejemplo de protocolo de supervisión en estudios de oncología

### 1. Pérdida de peso (en una semana)

- 0. Peso normal.
- 1. < 10%.
- 2. Entre un 10 y un 19%.
- 3. > 20% (eutanasia).

### 2. Signos clínicos

- 0. No aparentes.
- 1. Pelo «erizado», opaco y/o sucio.
- 2. Uno o más de los siguientes signos:
  - a) Secreciones mucosas y/o sanguinolentas por cualquier abertura.
  - b) Diarrea.
  - c) Órganos hipertrofiados detectables (ganglios, bazo, hígado).
- 3. Uno o más de los siguientes signos (eutanasia):
  - a) Distensión abdominal de cualquier origen
  - b) Presencia de ascitis que suponga un aumento superior al 10% del peso corporal inicial
  - c) Disnea (particularmente si va acompañada de descarga nasal y/o cianosis)
  - d) Caquexia.

### 3. Alteraciones en la conducta

0. No aparente.
1. Dificultad para moverse con normalidad.
2. Dificultad de llegar a la comida/bebida. Aislamiento del resto de los animales de la jaula. Disminución del movimiento.
3. Intención de «esconderse» en la viruta, no responde a estímulos, letargo o comatoso (eutanasia).

### 4. Tamaño del tumor

0. Sin tumor.
1. Tumores hasta 0,5 cm de diámetro. Dos tumores que sumen 0,5 cm.
2. Tumores de 0,6-1,5 cm de diámetro. Dos tumores que sumen más 0,5 cm.
3. Tumores de >1,5 cm de diámetro (eutanasia).

### 5. Heridas

0. Ninguna.
1. Arañazos, mordeduras, dermatitis leves o moderadas.
2. Heridas que no cicatrizan, agresiones severas, dermatitis graves o crónicas.
3. Tumores ulcerados o necróticos (eutanasia).

## Medidas correctoras

De 0-3: Normal. Supervisión una vez por semana.

De 4-8: Supervisión diaria. Posible existencia de dolor o angustia. Uso de analgésicos.

De 9-10: Revisión dos veces al día. Utilización obligada de analgésicos. Hay que plantearse el sacrificio del animal.

>10: Eutanasia

# Ejemplo de protocolo de supervisión en estudios de isquemia cerebral

## 1. Apariencia

1. Postura arqueada transitoria.
2. Piloerección, falta de acicalamiento.
3. Piloerección, postura arqueada, no acicalamiento (eutanasia).

## 2. Comportamiento natural

1. Poco activo.
2. Poco activo y aislado pero alerta.
3. Letárgico o inmóvil, no alerta (eutanasia).

## 3. Pérdida de peso (en una semana)

1. < 10%.
2. Entre un 10 y un 19%.
3. > 20% (eutanasia).

## 4. Anorexia

1. Apetito un poco reducido.
2. Huele la comida, pica algo.
3. Ningún interés por la comida.

## 5. Heces

1. Heces normales.
2. Heces blandas.
3. Heces líquidas (eutanasia).

## **Medidas correctoras**

De 0-3: Normal. Supervisión una vez por semana.

De 4-8: Supervisión diaria. Posible existencia de dolor o angustia. Uso de analgésicos y/o antiinflamatorios.

> 9: Eutanasia.