

# Guía práctica para la implementación de la Directiva 2010/63 aplicada a los animales genéticamente alterados

Grupo de Trabajo de la SECAL  
Ángel Naranjo<sup>1</sup> y Belén Pintado<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Responsable salud y bienestar animal. Centro Nacional de Biotecnología. CSIC.

<sup>2</sup> Responsable científico. Servicio de transgénesis CNB-CBM. CSIC.

## INTRODUCCIÓN

La Directiva 2010/63 ha supuesto un cambio radical en muchos aspectos relacionados con la experimentación animal en los países pertenecientes a la Unión Europea. La introducción en 2013 de nuevos conceptos dentro de la legislación, tales como evaluación de bienestar, uso continuado, severidad prospectiva o retrospectiva y los cambios en los informes de usos de animales desde el año 2014, obligan a modificar rutinas y adaptar los cambios al funcionamiento diario de los animalarios.

Nuestro objetivo es tratar de facilitar esta transición a los centros y aclarar conceptos para ayudar a una interpretación uniforme, centrándonos específicamente en los roedores genéticamente alterados. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- A. Explicar los cambios legislativos y su impacto en la solicitud de proyectos y la información que debe recopilarse en los informes estadísticos apoyándonos en situaciones reales.
- B. Revisar la implementación de la Directiva en situaciones prácticas de la gestión de colonias genéticamente alteradas.
- C. Explicar la realización de los estudios de bienestar preliminares.
- D. Aclarar el recuento de los usos de animales genéticamente alterados, la severidad asociada que se observará durante los procedimientos y su inclusión en el informe.

## A) IMPACTO DE LA DIRECTIVA 2010/63 EN LOS ANIMALES GENÉTICAMENTE ALTERADOS

Si tenemos en cuenta que aproximadamente un 65% de los animales utilizados en procedimientos en la Unión Europea son

ratones (1) y que en países en los que se dan resultados pormenorizados, casi la mitad de éstos se han destinado a la creación y mantenimiento de líneas genéticamente alteradas (2), se entiende la importancia de lograr una interpretación uniforme de los cambios legislativos.

Con este objetivo, la Comisión Europea reunió un grupo de expertos para clarificar los cambios y dar una serie de directrices que permitieran el cumplimiento de la legislación. Como resultado de esta reunión, se redactó un documento titulado "Documento de trabajo sobre animales genéticamente alterados" (3), aprobado por los representantes nacionales en su forma definitiva el 23 de enero de 2013 y que se puede consultar en el siguiente link:

[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/corrigendum.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/corrigendum.pdf)

Este documento resuelve muchas lagunas, pero, aun así, la aplicación práctica de la legislación va identificando "zonas grises" que se discuten para unificar criterios en una serie de reuniones periódicas que la Comisión Europea mantiene con las Autoridades Competentes de los países miembros. La unificación de criterios es esencial para que los datos estadísticos de los distintos países sean consistentes. Un ejemplo real de las diferencias en la interpretación ha sido la controversia sobre si la genotipación es o no un procedimiento y, por lo tanto, si requiere de un proyecto autorizado. Algunos países inicialmente lo consideraban un sistema de "identificación" y, consecuentemente, fuera del ámbito de aplicación de la Directiva. Sin embargo, la interpretación que se aceptó en una de estas reuniones es que el genotipado debe considerarse como procedimiento si la técnica utilizada produce una alteración del bienestar del animal igual o mayor a la definición de procedimiento.

A efectos prácticos, la biopsia de cola es siempre un sistema de genotipado invasivo. No sirve para identificar al animal, sino que es un procedimiento de obtención de tejido que se realiza en animales identificados previamente. Los sistemas de genotipación no invasivos son aquellos que se basan en características fenotípicas que pueden observarse sin tener que alterar el bienestar del animal, como por ejemplo el color u otro rasgo fenotípico visible. Cuando se ha realizado la identificación de los animales con muescas en la oreja o corte de falange y ese tejido se utiliza para hacer el genotipado, esto no se considera como "genotipado invasivo". Aunque pueda parecer contradictorio, la razón es que la identificación, como práctica pecuaria, no entra dentro del ámbito de la Directiva. En los casos en que el genotipado se hace a base de un subproducto resultante de la identificación no hace falta un proyecto autorizado. Dos documentos de FELASA (4,5) hacen una revisión exhaustiva de los sistemas de identificación y genotipación y pueden servir para decidir el sistema más adecuado para cada caso.

El nuevo marco legal marca tres modificaciones sustanciales respecto a la legislación vigente en España hasta la trasposición de la Directiva:

- 1) Ampliación del concepto de modificación genética. La Directiva habla de animales *genéticamente alterados*, incluyendo tanto a los animales modificados genéticamente en el laboratorio como a los animales en los que las modificaciones genéticas han aparecido de forma espontánea o inducida.
- 2) Modificación del concepto de "creación" de una línea genéticamente modificada. La Directiva 63/2010 puntualiza que el proceso de creación de una línea sólo termina cuando ésta esté establecida.
- 3) Obligación de contar con un proyecto autorizado por la autoridad competente para el mantenimiento de líneas con fenotipo adverso desde el punto de vista de bienestar animal.

### **1. Ampliación del concepto de modificación genética: impactopráctico**

La Directiva especifica claramente que quedan incluidas dentro del ámbito de protección tanto las modificaciones genéticas realizadas mediante técnicas de ADN recombinante, como las inducidas por agentes biológicos, físicos o químicos y las

aparecidas de forma espontánea. Anteriormente sólo se consideraban como creación de líneas genéticamente modificadas, aquellas que se obtenían mediante tecnología del ADN recombinante. El RD 53/2013 no excluye ningún sistema de inducción de alteraciones genéticas y, por tanto, es "creación" cualquier sistema que produzca una modificación de la información genética, independientemente de la técnica o el fenómeno causante.

Las dudas que pudieran surgir de la interpretación del Real Decreto, que mantiene la terminología "genéticamente modificado", quedan disipadas por la aclaración realizada por la Comisión Europea:

*Para el propósito de esta Directiva, los animales genéticamente alterados incluyen los animales genéticamente modificados (transgénicos, Knock out, Knock in y otras formas de alteración genética como las mediadas por CRISPR/Cas9) y las mutaciones naturales e inducidas a efectos de la definición dada en el artículo 3(1).*

Un caso práctico que ilustra este apartado es la obtención de animales con mutaciones inducidas por agentes químicos. La anterior legislación española no requería la solicitud de un proyecto de creación de línea genéticamente modificada si se utilizaba un agente de este tipo. El más representativo es la N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), que produce mutaciones puntuales en los espermatozoides y que son transmitidos a la siguiente generación.

Otro posible conflicto de interpretación podría darse cuando un experimento persigue obtener un genotipo que puede encontrarse en la Naturaleza. Es decir, generar mediante esta tecnología un animal que podría encontrarse perfectamente entre la población silvestre. Aunque pueda argumentarse que la alteración genética no es tal, porque se podría considerar como "natural", la tecnología utilizada es claramente un procedimiento que está buscando alterar la información genética preexistente en el individuo, aunque no dé lugar a ninguna patología, y por tanto requiere un proyecto autorizado. No hay un nivel mínimo de modificación. Incluso los animales que llevan una modificación puntual de un único nucleótido generados por cualquier sistema de edición génica, ZFN, TALENs o CRISPRs, deben considerarse genéticamente alterados y por tanto, incluidos en los conceptos de creación y establecimiento.

## 2. Modificación del concepto de "creación" de línea: impactoprático

Nuestro decreto RD 1201/2005 ya requería de un proyecto autorizado para la creación de líneas modificadas genéticamente, pero el término creación sólo incluía los animales necesarios para la obtención del fundador; es decir: hembras superovuladas, machos vasectomizados y hembras receptoras. La nueva legislación específica que la "creación" sólo termina cuando una línea está establecida. El concepto de "establecer" una línea es un término que ha sido aclarado específicamente por la Unión Europea para lograr una interpretación homogénea entre los países miembros.

El documento del grupo de trabajo, y aceptado por todos los Países Miembros, determina que para "establecer" una línea hace falta cumplir dos requisitos:

- que la transmisión de la alteración a la siguiente generación sea estable.
- que se haya realizado un estudio de bienestar.

### a) Trasmisión estable

La primera consecuencia práctica de tener que demostrar que la trasmisión es estable, es que, como mínimo, hay que estudiar dos generaciones y éstas se deben incluir en la fase de "creación". Podría asumirse que cualquier modificación que se ha incorporado en el genoma de un animal debería transmitirse a la siguiente generación siguiendo el esquema mendeliano o ligado al sexo. Esto es cierto en una gran mayoría de los casos, pero algunas técnicas de generación de animales genéticamente modificados pueden dar lugar a situaciones especiales. En algunos casos, lograr la "estabilidad" en la trasmisión es bastante más complejo y puede requerir un número mayor de generaciones.

Por ejemplo, en el caso de la mutagénesis dirigida, las quimeras que se obtienen por inyección de células ES raramente proceden de éstas en un 100% (ver Figura 1). En la mayoría de los casos hay células del embrión receptor y, por esa razón, los animales obtenidos a partir de esta técnica pueden no transmitir a la descendencia en la proporción esperada del 50%.



Imagen suministrada por la autoría

**Figura1.-** Quimera procedente de la microinyección de células ES de fondo C57BL/6N (negras) en embriones Hsd:ICR (albinos).

En el caso de la transgénesis aditiva, el transgén puede insertarse en más de un cromosoma. En estos casos hay que diseñar una estrategia de genotipación que permita separar las diferentes inserciones en líneas individualizadas.

Mención aparte requiere la nueva tecnología de la edición génica, especialmente la basada en los CRISPRs/Cas9. La eficiencia es tan grande que es posible obtener animales KO directamente - es decir, animales que presentan interrupción de un gen específico en sus dos alelos - pero esta tecnología potencialmente puede producir mutaciones fuera del lugar esperado (off-target) y debe de eliminarse esa posibilidad antes de realizar los estudios de caracterización fenotípica (6). En la práctica, esto puede suponer más de dos generaciones y todas las que sean necesarias deben de estar incluidas en el proyecto de creación. Todos los animales originados durante las diferentes generaciones necesarias se registrarán dentro del apartado de creación de líneas (ver Tabla 1).

**Tabla 1.-** Ejemplo del recuento de animales utilizados durante la creación de una línea genéticamente modificada hasta su establecimiento mediante transgénesis aditiva y microinyección de células ES y que deberían reflejarse en las estadísticas de usos de animales si utilizáramos sistemas de genotipación invasivos (biopsia de cola).

Tipo de animal	Transgénesis aditiva	Estadísticas RD 1201/05	Estadísticas RD53/2013	Microiny. células ES	Estadísticas RD 1201/05	Estadísticas RD53/2013
Hembras donantes de embriones	20	Si	Si	20	Si	Si
Hembras receptoras de embriones manipulados	10	Si	Si	6	Si	Si
Crías obtenidas	25	No	Si	10	No	Si
Determinación de la transmisión (F1) de cada positivo	20	No	Si	20	No	Si
Estudio preliminar de bienestar de cada línea (7 machos y 7 hembras, 3 camadas)	18-24	No	Si	18-24	No	Si
<b>Total</b>	<b>93-99</b>	<b>30</b>	<b>93-99</b>	<b>74-80</b>	<b>26</b>	<b>74-80</b>

## b) Estudio inicial de bienestar

El segundo requisito para poder establecer una línea es haber realizado un estudio que permita determinar si la alteración genética tiene alguna implicación en el bienestar del animal. La inmensa variabilidad de modificaciones genéticas hace prácticamente imposible definir un estudio tipo que permita identificar todas las posibles alteraciones de bienestar. La Comisión incluyó en un anexo una recomendación de estudio (3). Este esquema debe de servir de guía, pero es necesario adaptarlo a las características especiales de cada modificación que pueden hacer necesario incorporar una edad diferente para realizar la observación, o incorporar un criterio específico de evaluación.

A nivel práctico, tener que hacer un estudio inicial de bienestar dificulta el “establecimiento” de líneas desde el punto de vista legal. Si no está establecida la línea tendremos que seguir incluyendo en las estadísticas como “creación” todos los animales que se van produciendo tengan o no un fenotipo adverso.

### 3. Obligación de contar con un proyecto autorizado para el mantenimiento de líneas con fenotipo adverso: impactoprático

El tercer cambio esencial de la legislación actual es el requerimiento de un proyecto autorizado para el mantenimiento

de las líneas genéticamente alteradas ya establecidas, si se prevé que se puedan producirse animales que experimenten dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja conforme a las buenas prácticas veterinarias. Esta modificación legal no sólo afecta a los criadores comerciales, sino también a los centros que realizan cría de animales para su propio uso experimental. Debemos tener claro que la cría en sí, es un procedimiento cuando se realiza con líneas genéticamente alteradas no establecidas o cuando hay un fenotipo adverso.

La parte más controvertida es la interpretación práctica de “fenotipo adverso” y si la existencia de mecanismos de control que impidan la presentación de este fenotipo puede evitar la obligatoriedad de pedir un proyecto. En algunos casos, al caracterizar la línea durante la evaluación de bienestar que permitió establecer la línea, se determinó que las alteraciones del bienestar se manifiestan a partir de determinadas edades o determinados genotipos, como ocurre con las mutaciones que no dan fenotipo en heterocigosis pero sí lo hacen en homocigosis. En esos casos, si la cría garantizara no llegar nunca a las condiciones que permiten aparecer ese fenotipo, tal vez podría prescindirse de la solicitud de un proyecto, pero es un tema susceptible a interpretación y por ello, debería discutirse con la autoridad competente.

## B) IMPLEMENTACIÓN DE LA DIRECTIVA EN SITUACIONES PRÁCTICAS DE LA GESTIÓN DE COLONIAS GENÉTICAMENTE ALTERADAS

### Importación de líneas mutantes

Cuando un investigador solicita una línea genéticamente alterada que no se ha creado en el centro, debe saber si la línea ya está establecida o no, es decir, si se ha realizado un estudio de alteraciones del bienestar debidas a la alteración genética. Esa es la única manera de saber si durante el mantenimiento de la línea se van a producir animales con fenotipo adverso y si será necesaria la solicitud de un proyecto para su mantenimiento de acuerdo al RD53/21013.

Por ese motivo, cuando se intercambian modelos de ratón entre investigadores, sin ese estudio del bienestar habría que considerarlas como líneas no establecidas y por lo tanto, la importación requeriría un proyecto autorizado.

Lamentablemente, son muy pocos los casos en los que se ha hecho ese estudio siguiendo las recomendaciones dadas por el grupo de expertos para la interpretación de la directiva en el "Documento de trabajo sobre animales genéticamente alterados". La mayoría de los investigadores trabajan en campos concretos debido a la especialización. Cuando diseñan un nuevo modelo de ratón alterado genéticamente están pensando en las implicaciones fenotípicas que tendrá la alteración en su campo. Una vez obtenida la línea, estudian el fenotipo resultante en su campo de interés (inmunología, oncología, etc.) y raramente estudian otros fenotipos muy evidentes, como pueden ser los problemas reproductivos o de mortalidad.

### Líneas que llevan tiempo históricamente y no tienen un estudio de bienestar hecho

En muchos centros se han ido creando líneas genéticamente modificadas con las que los investigadores vienen trabajando y en las que no se ha hecho nunca un estudio de bienestar y por lo tanto, aunque lleven mucho tiempo utilizándolas o simplemente manteniéndolas, deberían considerarse también como líneas no establecidas. Esto supone que tienen que tener un proyecto para crear la línea y posteriormente para su mantenimiento en el caso que fuera necesario.

A nivel práctico está resultando un gran problema en los animalarios y uno de los puntos más conflictivos para incorporar la nueva legislación. Nuestra recomendación es tomar una

aproximación pragmática basada en la colaboración de los grupos de investigación y el OEBA del centro. Se valorarían las alteraciones fenotípicas de las diferentes líneas basándose en la información de los grupos de investigación y las observaciones de bienestar hechas por el personal del animalario. No es un estudio "tipo" de bienestar siguiendo el esquema sugerido por el documento de la Comisión, pero puede asumirse como un estudio válido. Según eso, las líneas podrían clasificarse en diferentes categorías:

- Líneas que no presenten alteraciones del bienestar y que no se genotipan, o en caso de hacerlo, no se utiliza un sistema invasivo: no requieren un proyecto de mantenimiento.
- Línea con alteraciones del bienestar leves, moderadas o severas: sí requieren de un proyecto de mantenimiento.
- Línea que aunque no tengan alteraciones del bienestar, se someten a una genotipación invasiva: sí requieren de un proyecto de mantenimiento.

El proyecto que se debe solicitar es para el mantenimiento de líneas genéticamente alteradas y en él sólo se incluyen los animales necesarios para realizar los cruces para el mantenimiento de la colonia y todos los animales que se obtienen y que NO se destinan a un protocolo experimental específico. Los que se destinan a protocolos experimentales específicos deben de reflejarse en la estadística en el apartado correspondiente al de la finalidad de su uso.

Cada línea genéticamente modificada es un mundo y por ello que sea esencial hacer un estudio de bienestar para poder determinar si hay o no alteración del mismo y poder asignarle un grado. Lo que las estadísticas deben de reflejar es la severidad real, no la teórica. Por eso es posible que dentro de una misma línea genéticamente alterada tengamos que reflejar en las estadísticas animales sin fenotipo, con alteraciones leves, moderadas o severas. Nuestra responsabilidad es tratar de minimizar la severidad y el número de animales utilizados, sin por ello comprometer los resultados científicos. En muchos casos, una buena programación de los cruces y de los sacrificios de excedentes puede suponer una gran diferencia.

### Líneas mutantes espontáneas

La Directiva se refiere a cualquier tipo de modificación genética, incluidas aquellas mutaciones espontáneas que dan

lugar a una alteración del bienestar. El documento explicativo de la Comisión es especialmente claro al mencionar que independientemente de las medidas de contención (una barrera SPF), si la mutación da lugar a un fenotipo potencialmente adverso, es necesario contar con un proyecto autorizado para el mantenimiento de la línea. Por ejemplo, líneas tales como los ratones conocidos como SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*), una mutación espontánea del gen *Prkdc<sup>scid</sup>* que elimina la inmunidad adaptativa y que en homocigosis conlleva una reducción severa en el número de linfocitos T y B, a pesar de no ser modelos generados en el laboratorio con tecnologías de ADN recombinante, están automáticamente incluidos en todas las regulaciones que afectan a los animales genéticamente alterados.

### Creación de un congénico

Cuando queremos pasar una mutación presente en una línea establecida que no tiene fenotipo adverso, no sería necesario *a priori* un proyecto autorizado, salvo que haya previsión de que la interacción de esa mutación con el fondo genético pueda producir un fenotipo adverso. Sin embargo, si durante el proceso se observa alguna alteración del bienestar, es necesario valorar si es debida a una interacción inesperada con la mutación, en cuyo caso habría que pedir un proyecto.

### Combinación de dos o más mutaciones en una única línea

Este es un proceso bastante frecuente, bien para generar modelos condicionales, modelos inducibles o simplemente para tratar de obtener un modelo de un proceso biológico que implica a varios genes. Aunque *a priori* las líneas originales no tengan fenotipo adverso, la combinación en un único individuo de esas mutaciones debe de considerarse como creación de una nueva línea y, por lo tanto, solicitarse un proyecto. Una vez realizada la evaluación de bienestar de esa "nueva" línea, se decidirá si es necesario un proyecto para mantenerla.

## **C) REALIZACIÓN PRÁCTICA DE UN ESTUDIO DE BIENESTAR**

En el "Documento de trabajo sobre animales genéticamente alterados", el grupo de expertos para la interpretación de la Directiva trató de perfilar las líneas principales para la realización de dichos estudios. Este documento es una guía que permite que todos los estudios de bienestar tengan enfoques similares, puedan compararse entre ellos, sirvan para modelos de diferentes campos de investigación y así, sea posible el compartirlos con otros grupos de investigación.

El estudio cubre diferentes estadios o edades del desarrollo y vida de los animales, ya que los fenotipos pueden desarrollarse a edades diferentes a los que los animales van a ser utilizados por cada grupo de investigación. Las observaciones se producirán al menos en tres fases de la vida del animal: al nacimiento, al destete y a la edad adulta. Además, se realizarán observaciones en otros momentos diferentes a estos 3 si se prevé que pueda aparecer entonces el fenotipo adverso; por ejemplo, si se trata de una enfermedad que sólo se manifiesta, por lo menos a nivel teórico, en fases de edad avanzada.

Como hemos comentado anteriormente, los investigadores están especializados en su campo y en muchos casos les resulta complejo observar otros fenotipos, motivo por el que en el documento anterior se describen los campos en los que realizar las observaciones (apariencia, tamaño, comportamiento, etc.). En relación a este punto es muy importante la formación en el reconocimiento de alteraciones en los animales. Si no tenemos conocimientos sobre el comportamiento y el aspecto de la especie animal con la que trabajamos y sobre la descripción de las alteraciones observadas, no podremos realizar un estudio del bienestar adecuado. De ahí la importancia de contar con la colaboración y la formación que aportan los técnicos que manejan los animales en los animalarios. Además, son los técnicos los que observan a los animales a diario y son los primeros en detectar alteraciones de los mismos.

El estudio de bienestar recomendado está basado en los protocolos de las primeras fases de fenotipado que se han desarrollado en los consorcios internacionales. Se llevará a cabo siguiendo los siguientes pasos:

1. Se realizará un planteamiento de cuál es el fenotipo esperado y en qué fases del desarrollo y momento de vida de los animales esperamos que afecte al bienestar. Por ejemplo, en ratones que desarrollen tumores mamarios a partir del destete -FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul- se realizarán evaluaciones con palpaciones mamarias en diferentes etapas tras el destete.
2. Se recogerán datos de al menos un mínimo de 7 machos y 7 hembras tomadas de al menos dos camadas diferentes, *wilde type* y alterados.
3. Se realizará en animales de al menos la segunda generación (de F2 en adelante).
4. Se tomarán, al menos, datos de los animales a tres edades: neonatos, animales al destete (21 días aprox.) y de edad madura (2 meses aprox.).

5. En aquellos casos en los que el fenotipo se desarrolle a otras edades, también se tomarán datos a edades representativas del fenotipo.
6. Se compararán los datos de los animales alterados genéticamente con animales controles similares y no alterados genéticamente.

El primer estadio en el que observaremos los animales es tras el nacimiento (neonatos). Durante esa fase no es conveniente manipular los animales, por lo que las observaciones se realizarán con la menor intervención posible. Se observará:

1. Morfología:
  - Color de los neonatos: su alteración puede indicar alteraciones tales como anemia, alteraciones de la circulación, etc.
2. Comportamiento:
  - Actividad de los neonatos: se evaluará la movilidad, reflejos de posición, etc.
  - Presencia de leche en el estómago: permite saber si los animales se alimentan y si la madre tiene alteraciones en la lactación o el cuidado de la camada.
3. El número y el desarrollo de los neonatos:
  - Características de la camada: se contabilizará el número de crías por camada, sexos, y evaluación del desarrollo de los neonatos.

En los siguientes estadios, como mínimo al destete y a los dos meses de edad, se observará:

1. Apariencia general.
2. Tamaño, conformación y crecimiento.
3. Pelaje.
4. Comportamiento.
5. Signos clínicos.
6. Tamaño relativo.
7. Mortalidad y necropsias.

Dichas observaciones se pueden realizar mediante unas tablas sistematizadas que permitan ver la evolución de la línea en las diferentes etapas (ver Tablas 2 y 3).

**Tabla 2.-** Observaciones en Neonatos.

	Actividad de los neonatos
Color de la piel	
Actividad de los neonatos	
Lactación ( <i>milk spot</i> )	
Camadas: tamaño, homogeneidad, etc.	
Observaciones	

**Tabla 3.-** Observaciones tras el destete.

	Destete (3sem.)	Madurez (8sem.)	Otros
Apariencia general (Morfología)			
Tamaño, conformación, y crecimiento			
Pelaje			
Comportamiento: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Postura</li> <li>- Marcha</li> <li>- Actividad</li> <li>- Interacción con el medio</li> </ul>			
Signos clínicos			
Tamaño relativo			
Número de animales en las etapas			
Observaciones			

Todas las anotaciones que realicemos deberían seguir definiciones objetivas, simples y claras que puedan entenderse tanto por los técnicos que manejan diariamente los animales, como por los investigadores que utilizarán el fenotipo de los animales.

Las observaciones se realizarán de forma similar a como se realiza la supervisión del bienestar durante los procedimientos. Se anotarán por cada animal las observaciones realizadas.

Podemos encontrar en guías o bases de datos nomenclatura estandarizada para descripción de signos clínicos (7, 8).

En algunas de estas observaciones se puede dar una puntuación numérica para indicar la gravedad. Es decir, si vemos diarreas podemos puntuar de 1 a 5 para indicar la gravedad de la misma.

Al finalizar el estudio de bienestar se realiza un informe en el que se resumen las alteraciones encontradas debidas al fenotipo de los animales. Este estudio de bienestar, las alteraciones

encontradas, las medidas propuestas para mejorarlo, junto con la nomenclatura oficial de la línea y las características de la alteración genética es lo que podría constituir el “pasaporte” de la línea (ver Anexo I), un documento que facilitaría enormemente el intercambio de líneas mutantes entre investigadores y contribuiría positivamente al bienestar de los animales. Entre otras ventajas podemos destacar que:

- Evitaría tener que pedir un proyecto en los casos en los que la línea no desarrolla un fenotipo adverso.
- También, en algunos casos, podría reducir la severidad del proyecto si conocemos en qué momento se produce la alteración del bienestar de la línea y ponemos las medidas adecuadas para evitarlo o realizamos un mantenimiento sin llegar a esas edades.
- Evitaría que los investigadores que tienen que utilizar esta línea por primera vez tuvieran que solicitar un proyecto para llevar a cabo el establecimiento de la línea, con la consiguiente pérdida de tiempo y recursos.
- Así mismo, se reduciría el número de animales necesarios al no tener que realizar, en cada uno de los centros, el establecimiento de la línea.

Podemos ver un [ejemplo de evaluación](#) en una línea ya creada en el anexo II.

### D) RECUESTO DE LOS ANIMALES

La nueva legislación ha supuesto un cambio en el recuento de los animales de las líneas con alteraciones genéticas, tanto para su creación como para su mantenimiento.

Debemos separar los animales que se utilizan para la creación de los animales que se utilizan para el mantenimiento. Creación incluye no sólo líneas nuevas que se desarrollan mediante cualquier sistema de manipulación genética, sino también cuando por primera vez se realiza el cruce de dos líneas mutantes para obtener una tercera, como mencionamos en el apartado B. Hasta que no se realiza la evaluación de bienestar de la línea resultante, todos los animales producidos se incluyen siguiendo los criterios de creación reflejados en la Tabla 4.

**Tabla 4.-** Recuento de animales utilizados para la creación de una línea genéticamente modificada.

Tipo de animal	Creación
Hembras donantes (Procedimiento superovulación)	Si
Machos vasectomizados (procedimiento vasectomía)	Si
Hembras receptoras (transferencia quirúrgica)	Si

	CON GENOTIPACION MEDIANTE BIOPSIA DE COLA	SIN GENOTIPACION MEDIANTE BIOPSIA DE COLA
Con mutación	Si	Si
Sin mutación	Si	No
<b>Total</b>	TODOS	SOLO LOS MUTANTES

Dentro de la creación de la línea contaremos:

- Los animales que se utilizan para donar y recibir embriones como animales no alterados genéticamente. Los animales que nazcan alterados genéticamente tengan o no fenotipo adverso.
- Todos los animales a los que haya que realizar biopsias de cola para genotipar independientemente de que sean genéticamente alterados o no.
- En este último caso, los animales que al genotipar por métodos invasivos no han incorporado la modificación genética se contarán como no alterados genéticamente.

En todos los casos se les asignará el grado de severidad real observado, que puede coincidir o no con el predicho en la solicitud del proyecto.

Una vez se ha establecido la línea de acuerdo con los criterios de transmisión predecible y evaluación de bienestar, hay que incluir en el informe estadístico TODOS los animales que se destinan a procedimientos incluidos en proyectos autorizados. En ese caso, se incluyen bajo la finalidad que se especifica en cada proyecto y la severidad real que se haya observado, independientemente de que la nueva línea tenga o no fenotipo adverso.

De la misma manera, si un animal genéticamente alterado con fenotipo dañino se sacrifica para la obtención de órganos y tejidos, se le contabilizará en la finalidad de la investigación que requiera el uso de esos órganos.

En las líneas establecidas sin fenotipo adverso, los animales utilizados para el mantenimiento no requieren proyecto y, por lo tanto, no tienen que incluirse en el informe estadístico.

En las líneas establecidas con fenotipo adverso, se incluyen dentro de la finalidad "mantenimiento de líneas genéticamente alteradas" todos aquellos animales destinados a cruces para generación de animales y todos los animales portadores de la mutación que NO se utilicen en otros proyectos o para obtención de órganos y tejidos, como es el caso de los excedentes de cría.

La validación realizada por la autoridad competente de los primeros informes correspondientes a 2014 detecta como error que hayan podido incluirse animales no alterados genéticamente en el "mantenimiento de líneas genéticamente alteradas". La causa es que se han reportado animales sin la mutación, pero sometidos a un sistema de genotipación invasivo, razón por la que hay que incluirlos en las estadísticas. La sustitución paulatina de las biopsias de cola como sistema estándar de genotipado corregirá esta situación.

**Tabla 5.-** Recuento de animales utilizados para el mantenimiento de una línea genéticamente modificada. NO se contarán en mantenimiento los animales utilizados posteriormente en otros procedimientos.

Tipo de animal	Mantenimiento
Animales SIN fenotipo adverso	No
Animales CON necesidad de Biopsia de cola	SI. Si tienen la mutación (como modificados) SI. Si NO tienen la mutación (como no modificados)
Animales CON fenotipo adverso	SI (como modificados genéticamente)

**RECOMENDACIONES FINALES**

En la práctica, todavía es difícil de valorar el impacto de la Directiva en el número de animales utilizados en experimentación animal. Hemos experimentado una etapa de transición en la que han convivido en el tiempo proyectos autorizados por la legislación previa a la publicación del RD 53/2013 y aquellos sujetos ya a la nueva normativa. Las estadísticas de 2014 han supuesto un periodo de rodaje necesario para adaptarnos a los nuevos recuentos estadísticos y ha sido el desencadenante de numerosas dudas, que posiblemente se hayan solventado de forma diferente. La complejidad de los modelos genéticamente modificados es tal, que es muy difícil marcar una directriz clara entre lo que es fenotipo adverso o no y si ciertas situaciones, como por ejemplo generar un congénico, es creación de una nueva línea mutante.

Nuestra intención en este trabajo ha sido dar una serie de criterios que ayuden a interpretar y desarrollar correctamente la legislación y con ello facilitar su implementación uniforme. También hemos tratado de identificar puntos que permitan reducir de forma sensible el número de animales utilizados. Por ejemplo, facilitando el "establecimiento" de líneas en nuestros centros e intercambiando la información en una base de datos común, ya que la legislación exige un estudio de bienestar, pero no un estudio de bienestar en cada centro. También incorporando los sistemas de genotipación no invasiva o fomentando la criopreservación de líneas. Con estas actuaciones podremos contribuir de forma clara y directa al bienestar animal y a la implementación de las 3Rs, que es en resumen el objetivo de la legislación.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Daneshian M., Busquet F., Hartung T., and Leist M. *Animal Use for Science in Europe*. *Altex* 2015, 32(4): 261-74.
2. <https://speakingofresearch.com/facts/uk-statistics/>
3. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/corrigendum.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/corrigendum.pdf)
4. Bonaparte D., Cinelli P., Douni E., et al. *FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group*. *Lab Anim.* 2013, 47(3):134-45.
5. Dahlborn K., Bugnon P., Nevalainen T., et al. *Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification*. *Lab Anim.* 2013, 47:2-11.

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bugnon%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=23467487](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bugnon%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23467487) Bugnon P.,

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nevalainen%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=23467487](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nevalainen%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23467487) Nevalainen T., et al. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467487> "Laboratory animals." *Lab Anim.* 2013, 47:2-11.

6. Iyer V., Shen B., Zhang W., et al. *Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice*. *Nature Methods* 2015, 12(6):479.
7. Fentener van Vlissingen J.M., Borrens M., Girod A. et al. *The reporting of clinical signs in laboratory animals*. *FELASA Working Group Report*. *Laboratory Animals* 2015, 49(4):267-83.
8. Mouse Welfare Terms (<http://www.mousewelfareterms.org/doku.php>)

## Anexo I

### ESTUDIO DE BIENESTAR DE LÍNEAS DE RATONES GENÉTICAMENTE ALTERADAS

#### 1. DATOS DEL CENTRO DONDE SE DESARROLLA EL ESTUDIO

Nombre del Centro/Empresa/Instituto

Número de registro

#### 2. DATOS DEL INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL ESTUDIO (deberá estar reconocida su capacitación)

Nombre del Centro/Empresa/Instituto al que pertenece el investigador

Apellidos y Nombre

NIF

Teléfono

Fax

E-mail

#### 3. DATOS DEL USUARIO QUE LLEVARÁ A CABO EL ESTUDIO (deberá estar reconocida su capacitación)

Nombre del Centro/Empresa/Instituto al que pertenece el usuario

Apellidos y Nombre

NIF

Teléfono

Fax

E-mail

#### 4. NOMBRE COMÚN DE LA CEPA DE RATONES

#### 5. FECHA DE INICIO Y FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO (máximo 5 años)

Fecha prevista de inicio del estudio

Fecha prevista de finalización del estudio

#### 6. RESUMEN DE LA ALTERACION GENÉTICA Y OBJETIVO CIENTÍFICO.

**7. DATOS DE LA CEPA**

Procedencia <sup>1</sup>			
Cepa (nombre oficial) <sup>2</sup>			
Tipo de modificación <sup>3</sup>			
Sistema de cruce <sup>4</sup>			
Generación (F, N)			
Genotipos utilizados			
Sexos utilizados			
Edad máxima de uso			
OBSERVACIONES			

**8. DATOS GENÉTICOS (rellenar aquellos que correspondan)**

Nombre y símbolo del/os GEN alterado			
Nº de Cromosoma (situación del gen)			
GEN expresado (Transgénicos)			
Promotor (Transgénicos)			
Nombre y símbolo de/los ALELO alterado			
Línea ES de procedencia			
Cepa de procedencia de la línea ES			
OBSERVACIONES			

**9. ESTUDIO DEL BIENESTAR**

- Incluir animales de grupos de edades representativas:
  - i) Neonatos, animales al destete (21 días aprox.), y de edad madura (2 meses aprox.)<sup>5</sup>
  - ii) Al menos un mínimo de 7 machos y 7 hembras tomados de al menos dos camadas diferentes.
  - iii) El estudio tomará animales de al menos la segunda generación (de F2 en adelante).
  - iv) Se compararán los datos de los animales alterados genéticamente con animales controles similares y no alterados genéticamente.

**9.1. DESCRIPCIÓN DEL FENOTIPO ESPERADO**

1. Del centro o de otro criador o suministrador (Vgr: Charles River, Harlan, Jackson, etc.)  
 2. <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>  
 3. Mutación espontánea, Transgénico, Mutación dirigida (Targeted mutation), Mutación por agentes químicos (ENU), Congénico, Complástico, etc.  
 4. Homocigoto x homocigoto, homocigoto x heterocigoto, etc.  
 5. Incluir otras edades en el caso de que la alteración genética pueda manifestarse en esos momentos alterando el bienestar de los animales.

## 9.2. DATOS OBSERVADOS<sup>6</sup>

	Destete (3 sem.)	Madurez (8 sem.)	Otros
Apariencia general (Morfología)			
Tamaño, conformación, y crecimiento			
Pelaje			
Comportamiento: - Postura - Marcha - Actividad - Interacción con el medio			
Signos clínicos (Descripción de signos clínicos)			
Crecimiento			
Número de animales en las diferentes etapas			
Observaciones			

	Observaciones en Neonatos
Color de la piel	
Actividad de los neonatos	
Lactación (milk spot)	
Camadas: tamaño, homogeneidad, etc.	
Observaciones	

## 10. RESUMEN DEL RESULTADO DEL ESTUDIO DEL BIENESTAR

## 11. REQUERIMIENTO DE PROYECTO

(¿Requiere el mantenimiento de esta cepa de ratones alterados genéticamente la solicitud de un proyecto?)

Si  No

## 12. VISTO BUENO DEL OEBA

Apellidos y Nombre

Número de registro

Fecha, firma y sello

Fecha y firma del investigador Responsable del Estudio

.....

6. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/corrigendum.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/corrigendum.pdf)

.....

## Anexo II

### ESTUDIO DE BIENESTAR DE LÍNEAS DE RATONES GENÉTICAMENTE ALTERADAS

#### 1. DATOS DEL CENTRO DONDE SE DESARROLLA EL ESTUDIO

Nombre del Centro/Empresa/Instituto

Número de registro

#### 2. DATOS DEL INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL ESTUDIO (deberá estar reconocida su capacitación)

Nombre del Centro/Empresa/Instituto al que pertenece el investigador

Apellidos y Nombre

NIF

Teléfono

Fax

E-mail

#### 3. DATOS DEL USUARIO QUE LLEVARÁ A CABO EL ESTUDIO (deberá estar reconocida su capacitación)

Nombre del Centro/Empresa/Instituto al que pertenece el usuario

Apellidos y Nombre

NIF

Teléfono

Fax

E-mail

#### 4. NOMBRE COMÚN DE LA CEPA DE RATONES

#### 5. FECHA DE INICIO Y FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO (máximo 5 años)

Fecha prevista de inicio del estudio

Fecha prevista de finalización del estudio

#### 6. RESUMEN DE LA ALTERACION GENÉTICA Y OBJETIVO CIENTÍFICO.

Transgénico que expresa un antígeno del poliomavirus bajo el promotor LTR del MMTV. La expresión se realizará en tejido glandular, fundamentalmente en glándula mamaria, siendo posible también su expresión en pulmón, vesículas seminales, y ovarios. Modelo para testar tratamiento frente a tumores de mama con metástasis.

## 7. DATOS DE LA CEPA

Procedencia <sup>1</sup>	URGG		
Cepa (nombre oficial) <sup>2</sup>	<b>FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J</b>		
Tipo de modificación <sup>3</sup>	Transgénico		
Sistema de cruce <sup>4</sup>	Wt x Hemicigoto		
Generación (F, N)	¿?		
Genotipos utilizados	hemicigoto		
Sexos utilizados	Hembras y machos		
Edad máxima de uso	3 meses		
OBSERVACIONES			

## 8. DATOS GENÉTICOS (rellenar aquellos que correspondan)

Nombre y símbolo del/os GEN alterado	Tg(MMTV-PyVT)634Mul		
Nº de Cromosoma (situación del gen)	¿?		
GEN expresado (Transgénicos)	Tg(MMTV-PyVT)634Mul		
Promotor (Transgénicos)	MMTV		
Nombre y símbolo de/los ALELO alterado	¿?		
Línea ES de procedencia			
Cepa de procedencia de la línea ES			
OBSERVACIONES			

## 9. ESTUDIO DEL BIENESTAR

- Incluir animales de grupos de edades representativas:
  - i) Neonatos, animales al destete (21 días aprox.), y de edad madura (2 meses aprox.)<sup>5</sup>
  - ii) Al menos un mínimo de 7 machos y 7 hembras tomados de al menos dos camadas diferentes.
  - iii) El estudio tomará animales de al menos la segunda generación (de F2 en adelante).
  - iv) Se compararán los datos de los animales alterados genéticamente con animales controles similares y no alterados genéticamente.

### 9.1. DESCRIPCIÓN DEL FENOTIPO ESPERADO

Las hembras desarrollaran tumores mamarios. No se espera otro fenotipo.

1. Del centro o de otro criador o suministrador (Vgr: Charles River, Harlan, Jackson, etc.)

2. <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>

3. Mutación espontánea, Transgénico, Mutación dirigida (Targeted mutation), Mutación por agentes químicos (ENU), Congénico, Complástico, etc.

4. Homocigoto x homocigoto, homocigoto x heterocigoto, etc.

5. Incluir otras edades en el caso de que la alteración genética pueda manifestarse en esos momentos alterando el bienestar de los animales.

9.2. DATOS OBSERVADOS<sup>6</sup>

	Destete (3 sem.)	Madurez (8 sem.)	3 Meses	4 Meses
<b>Apariencia general (Morfología)</b>	Normal	Normal	Normal	Normal
<b>Tamaño, conformación, y crecimiento</b>	Normal	Pérdida peso hembras, normal machos	Pérdida de peso en machos	Pérdida de peso
<b>Pelaje</b>	Normal	Descuidado hembras, normal machos	Descuidado en machos	Piloerección
<b>Comportamiento: Postura, Marcha, Actividad, Interacción con el medio</b>	Normal	Normal	Normal	Postura encorvada
<b>Signos clínicos (Descripción de signos clínicos)</b>	Sin presencia	Palpación de nódulos consistentes en mamas en hembras	Palpación de nódulos en zona inguinal y glándulas salivares en macho	Palpación de nódulos mamarios. Alteraciones respiratorias y de la micción
<b>Crecimiento</b>	Normal	Curva de crecimiento menor en hembras	Curva de crecimiento menor que cepa de referencia	
<b>Número de animales en las diferentes etapas</b>	Sin mortalidad al destete	Sin mortalidad diferentes a la cepa de referencia	Mortalidad de hembras a partir de la semana 8	Sacrificio humanitario de los animales
<b>Observaciones</b>			Sacrificio humanitario de hembras a las 10 semanas	

	Observaciones en Neonatos
<b>Color de la piel</b>	Normal
<b>Actividad de los neonatos</b>	Normal
<b>Lactación (milk spot)</b>	Presente
<b>Camadas: tamaño, homogeneidad, etc.</b>	8 crías por camada. Homogéneas y dentro de los valores de la cepa de referencia FVB/N
<b>Observaciones</b>	Normal

10. RESUMEN DEL RESULTADO DEL ESTUDIO DEL BIENESTAR

Las hembras hemicigotas MMTV-PyMT desarrollan tumores palpables a partir de la semana 5. A la necropsia se observaron metástasis pulmonares. Las hembras no pueden tener lactaciones a partir de la semana 5 por lo que es necesario el mantenimiento de las crías con hembras wt mediante cruces de hembra wt x macho hemicigoto. Los machos desarrollan tumores mamarios a partir del día 83. En las necropsias se observaron metástasis en pulmón. También se observaron tumores en glándulas prepuciales. Alteraciones respiratorias y de la micción en los animales con tumores en glándulas del sistema urinario y pulmonar.

11. REQUERIMIENTO DE PROYECTO

(¿Requiere el mantenimiento de esta cepa de ratones alterados genéticamente la solicitud de un proyecto?)

Si  No

12. VISTO BUENO DEL OEBA

Apellidos y Nombre

Número de registro

Fecha, firma y sello

Fecha y firma del investigador Responsable del Estudio

.....

6. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/corrigendum.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/corrigendum.pdf)

.....