

Gestión del bienestar en los peces de experimentación

Juan Ramos Blasco

Licenciado en Veterinaria

Técnico superior en producción acuícola

Master en ciencias y bienestar en animales de experimentación



Recepción: Septiembre 2019

Aceptación: Octubre 2019

Cita recomendada. RAMOS BLASCO, J., Gestión del bienestar en los peces de experimentación, dA. Derecho Animal (Forum of Animal Law Studies) 10/4 (2019) - DOI <https://doi.org/10.5565/rev/da.457>

Resumen

La gestión del bienestar de los peces de experimentación viene regulada en la legislación, pero su aplicación práctica requiere una traslación a la especie utilizada, así como a los requerimientos del experimento. Existen una serie de controles previos reflejados en los proyectos y procedimientos experimentales, así como una evaluación retrospectiva, todo encaminado a la revisión continuada y al refinamiento. Pero al final, en la gestión del bienestar están involucrados los investigadores, los cuidadores y el asesor de bienestar animal, que han de ser formados adecuadamente para las distintas técnicas. De esta manera se disminuye el impacto sobre el bienestar de los peces y se aumenta la significancia de las experiencias.

Palabras clave: pez cebra, bienestar peces, procedimientos experimentales, refinamiento.

Abstract - *Management of welfare of experimental in research fish*

The welfare management of experimental fish is regulated in the legislation, but its practical application requires a translation to the species used, as well as the requirements of the experiment. There are some previous controls reflected in the experimental projects and procedures, as well as a retrospective evaluation aimed at continuous review and refinement of the experiences. But in the end in the management of welfare, researchers, caregivers and the animal welfare consultants are involved and have to be properly trained for the different techniques. In this way the impact on the welfare of the fish is reduced and the significance of the experiences increased

Keywords: zebrafish, fish welfare, experimental procedures, refinement.

Marco legal y científico

Se entiende tradicionalmente (1979, UK Farm Animal Welfare Council) el bienestar animal cómo un animal libre de hambre, disconfort, dolor o enfermedad, miedo y capaz de expresar su comportamiento o comúnmente conocido como las cinco libertades. En el caso de los peces deberemos adaptarlo a cada especie en concreto, debido a su variabilidad biológica y enmarcarlo en un ámbito social, legal y ético. Según la especie deberemos definir: los parámetros del agua (pH, temperatura, oxígeno, salinidad...), sus condiciones sociales (si está en un banco o comparte acuario con otras especies o con algún congénere dominante), la alimentación (que se adecuada en composición y presentación a su estadio de desarrollo), las manipulaciones que realicemos (cruces, pesca, anestesias, manejo, cirugías) y a su estatus genético o sanitario. Todos estos conceptos permitirán a un pez desarrollar sus funciones biológicas con normalidad es decir tener bienestar.

La sociedad ha adoptado un nuevo enfoque ético, que está calando en las nuevas generaciones, respecto al uso de los animales con distintos fines (mascotas, animales de producción, de trabajo y de experimentación)¹. Pero el grado de concienciación depende notablemente del grupo taxonómico, siendo los peces lo grandes olvidados de los vertebrados². Despiertan mucha más empatía los mamíferos, incluso las aves, que los peces. Por ello se sigue considerando a los peces, como un bloque de animales homogéneo, a pesar de la gran variabilidad biológica que presentan, incluyéndose bajo este nombre a los agnatos (lampreas, myxines), osteictios (peces óseos) y condrocitos (tiburones y rayas).

Paralelo a este cambio social, la legislación ha avanzado hacia una creciente protección sobre los animales de experimentación, siendo incluidos los peces en la última edición de su reglamentación, al igual que los cefalópodos.

El bienestar en los peces usados con fines científicos viene regulado una directiva europea (Directiva 2010/63/UE) y su transposición española (Real Decreto 53/2013) y por lo tanto será el marco regulatorio mínimo al que hemos de atender, aunque se ha de recurrir a otras fuentes que nos permitan establecer criterios para su aplicación práctica. En ella se considera a todas las especies de peces en un mismo apartado, a diferencia de otros vertebrados como los mamíferos en los que ese consideran separadamente ratas, ratones, cerdos etc. Lo que hace imposible definir parámetros y concretar las condiciones óptimas; debido a la gran variedad de especies y adaptaciones biológicas que presentan los distintos grupos taxonómicos que engloba el término pez (agnatos, condricios, osteictios). Los peces se emplean con fines científicos en diversos aspectos de la producción animal, biología y etología³. En biomedicina y toxicología destacan dos modelos, el pez cebra y el medaka que han aumentado exponencialmente su uso en los últimos años y en el número de publicaciones⁴. Es por ello que no se llega a concretar ningún parámetro en la ley, sino que más bien se habla genéricamente de los puntos que afectan al bienestar de los peces: el origen y la calidad del agua (especialmente pH, O₂, salinidad y compuestos nitrogenados), el ambiente (temperatura, ruido e iluminación), las condiciones sociales (densidad y alojamiento), así como la alimentación y el manejo.

A parte de los criterios establecidos por la ley se aplican otros conceptos trasladados de las investigaciones científicas como por ejemplo el principio de las 3 R⁵:

- *Reemplazo*: siempre que sea posible se evitará el uso de animales o en su defecto se emplearían modelos animales inferiores (invertebrados: la mosca *D. Melaganogaster* o el gusano *C. Elegans* por ejemplo)
- *Reducción*: el diseño experimental y la elección del modelo será lo más significativo posible a fin de poder reducir el uso de animales sin afectar la significancia estadística.
- *Refinamiento*: la ejecución práctica buscará ser lo menos invasiva y agresiva posible para disminuir las implicaciones sobre el bienestar.

¹ Eurobarómetro 442 sobre el bienestar animal (2015)

² LUND, V., MEJDELL, C. M., RÖCKLINSBERG, H., ANTHONY, R., HÅSTEIN, T., Expanding the moral circle: Farmed fish as objects of moral concern. *Diseases of Aquatic Organisms* (2007): <https://doi.org/10.3354/dao075109>

³ JOHANSEN, R., NEEDHAM, J. R., COLQUHOUN, D. J., POPPE, T. T., & SMITH, A. J., Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* (2006): <https://doi.org/10.1258/002367706778476451>

⁴ KINTH, P., MAHESH, G., & PANWAR, Y., Mapping of zebrafish research: A global outlook. *Zebrafish* (2013): <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0854>

⁵ KIRK, R.G.W., Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Science Technology and Human Values* (2018): <https://doi.org/10.1177/0162243917726579>

Controles previos a la experimentación

Para asegurar la aplicación de estos principios se establecen una serie de requisitos administrativos y técnicos que se formalizan a través de los procedimientos experimentales y los comités éticos de experimentación animal.

- Se ha de cumplimentar un proyecto de investigación en el cual se detalla de manera estandarizada desde la justificación del uso de animales, el modelo elegido y el número de animales utilizados; pasando por una descripción del procedimiento experimental (administración de productos, modificaciones de las condiciones de mantenimiento). También se han de especificar las revisiones del bienestar animal, hasta el criterio de punto final del procedimiento y los métodos de eutanasia que se emplearán para ello. Además, se incluirá un resumen no-técnico, una explicación del proyecto en un lenguaje fácil de entender por cualquier persona, que será público y de libre acceso.
- Todo procedimiento experimental ha de ser evaluado por un comité ético de manera preliminar, que revisará y corregirá el procedimiento de experimentación animal y sus justificaciones. Tras ello se procederá a una segunda revisión por parte del órgano habilitado de cada comunidad autónoma, antes de que se pueda proceder a su realización.
- Las personas que trabajan con animales de experimentación han de superar unos cursos de capacitación según las funciones que vayan a desempeñar y la especie que vayan a trabajar. De tal manera que todo aquel interesado en trabajar con animales de experimentación, ha de recibir una formación específica en bienestar animal, y además han de superar un periodo de trabajo bajo supervisión de otra persona con experiencia en dichos procedimientos. De esta manera se asegura una formación específica para realizar las técnicas experimentales.
- Los animales deben proceder de un centro autorizado para la cría de animales de experimentación, bajo unas condiciones controladas; tanto genéticas como de bioseguridad adecuadas. que eviten que se infecten por patógenos o puedan infectar a las personas (zoonosis).
- Los procedimientos se deben realizar en instalaciones autorizadas para los distintos procedimientos y especies según las implicaciones sobre la bioseguridad que tengan los mismos.
- Se han de realizar controles diarios a todos los animales verificando su bienestar y de una manera específica a aquellos que se le ha sometido a un procedimiento experimental. Para ello debe existir un asesor de bienestar responsable de dichos controles.

Gestión del bienestar: *in situ* y *a priori*

Toda esta serie de requerimientos, van encaminados a que exista un control diario y efectivo sobre los peces de experimentación; traducándose en una serie de criterios objetivos, que son examinados de manera general en todos los peces cada día (**in situ**). Estos criterios abarcan desde la calidad del agua (pH, oxígeno, conductividad, Temperatura), a la sala y los equipamientos (Luz, ruidos, filtraciones, bombas), hasta los animales (condición corporal, natación, alimentación...).

Además de una manera específica y detallada se realizará en los animales bajo un procedimiento experimental, tanto en forma como en tiempo, usando unas tablas diseñadas *ad-hoc* para cada procedimiento experimental. El diseño de tablas que permitan evaluar lo más objetivamente posible el bienestar de los peces, es necesario. Para ello se dan valores relativos a los distintos elementos a evaluar del pez según estén normales (se puntúa con cero) o sufran algún tipo de alteración (cuanto más severa sea mayor puntuación se le asignara). Así pues, si un pez presenta un comportamiento normalizado se le asignará un 0, un 1 si está nervioso y un 3 si está apático, por ejemplo. Este proceso se realiza con otros conceptos como pueden ser, el color de la librea (color de la piel), la integridad de las escamas o las aletas, la forma de nadar o de respirar, la ingesta de comida, presencia de masas o ulceraciones, ... Cada valor de los distintos conceptos se irá sumando a los de los otros criterios evaluados del pez a fin de poder evaluar el grado de bienestar animal, con un valor final. También, se pre-establecerá un valor, a partir del cual el pez se ha de eutanasiar, ya que no se puede justificar la experimentación por el malestar causado. Si se alcanza el valor pre-establecido, por la suma de los distintos criterios, se procederá a la eutanasia. Además, la recopilación de los valores obtenidos en estas tablas, permite establecer el grado de severidad de los distintos procedimientos y técnicas experimentales y ajustarlos de una manera periódica, gracias al resultado de las experiencias obtenidas, de una manera retrospectiva.

Esta filosofía retrospectiva de la experimentación animal y por lo tanto con los peces permite una

visión autocrítica, a fin de evaluar la mejor técnica experimental, para realizar un experimento. De esta manera el refinamiento se aplica continuamente, disminuyendo los grados de severidad y la afección sobre el bienestar animal. Además, tanto técnicos, como investigadores, están obligados a realizar cursos de formación que les permitan estar actualizados en las nuevas técnicas existentes. Lo que permite la unión de la gestión *a priori* e *in situ* del bienestar, de manera que se retroalimenten mutuamente.

A priori, podremos aplicar el bienestar mediante el diseño de las instalaciones, la definición de los parámetros del agua, la gestión de la población y de los estadios intermedios, el diseño de los controles y gestión del status sanitario, el control de las colonias, los protocolos de alimentación y de enriquecimiento, entre muchas otras cosas. Muchas veces este trabajo de gestión puede pasar desapercibido ya que evita las alteraciones en el bienestar y por lo tanto la aplicación paliativa del bienestar o *in situ*, gracias a esta experiencia previa. Esta aplicación paliativa, aunque sea siempre necesaria debería ser aplicada cada vez menos debido al proceso continuo del refinamiento y revisión de los procedimientos. Puede tener a su vez muchas formas, como la aplicación de fármacos y anestésicos, cirugías menores, modificación del ambiente en los animales aislados, la suspensión de los experimentos o incluso la eutanasia de los peces.

Hay que recalcar que una gran mayoría de los procedimientos en pez cebrá se realizan con los embriones que no son considerados como animales de experimentación legalmente hablando⁶. Para la obtención de estas formas de desarrollo es necesario realizar cruces entre los peces y que éstos sean eficaces. La gestión de los cruces tiene por lo tanto una importancia muy alta y se aplican gran cantidad de formas de enriquecimiento, a fin de maximizar dichos índices reproductivos⁷. Estos índices reproductivos pueden ser utilizados como un indicador indirecto del bienestar, ya que es la última función biológica en realizarse y es fácilmente cuantificable. Así pues, cualquier alteración que sufra el pez ya sea nutritiva, social, fisiológica o patológica se traducirá en una alteración de las tasas de viabilidad, fecundidad y fertilidad de los huevos. Es por ello que una disminución en el número de huevos fértiles obtenidos, indica un problema subyacente, que puede ser de muy diversa etiología.

Los sistemas de enriquecimiento pueden adoptar diversas formas, pero van encaminados a facilitar la adaptación del animal a la cautividad y mejorar su bienestar fisiológico y psicológico, lo que se traduce en una mejora de los índices zootécnicos⁸. En la investigación con animales se ha demostrado su importancia y se investigan nuevas formas de aplicarlos, a fin de emular las condiciones naturales, sin alterar el desarrollo de las experiencias⁹. En pez cebrá se ha demostrado la necesidad de tenerlos en grupos sociales adecuados, tanto en número como en tamaño (más de 10 peces), y descartar el uso de plantas, que serán sólo usadas cuando estén en aislamiento (9). También el uso de alimento vivo como la *Artemia* es una forma eficaz de mejorar los índices reproductivos, por el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y estimular su instinto depredador¹⁰. La dieta natural del pez cebrá, originario de Asia¹¹, está compuesta básicamente por invertebrados, especialmente en la época monzónica, que es la que prefieren para su reproducción¹². También se aplican otras técnicas, cómo la existencia de un gradiente de profundidades o la modificación del sustrato, a fin de que sea oscuro y con granulometría. Esto se debe a que prefieren poner los huevos en la orilla de las masas de agua y entre gravilla y vegetación¹³; asegurando así su oxigenación y evitando la depredación de la puesta. También se ha demostrado la importancia de tener un fotoperíodo controlado, con un amanecer regulado, tanto en tiempo como en intensidad, para tener éxito en la reproducción¹⁴.

Todas estas técnicas se han ido estandarizando internacionalmente entre los distintos animalarios, que tienen pez cebrá, gracias al trabajo de distintas asociaciones como FELASA (Federation for Laboratory Animal Science Associations) o ZHA (Zebrafish Husbandry Association). Esto ha conllevado un mejor

⁶ ALI, S., CHAMPAGNE, D.L., SPAINK, H.P., RICHARDSON, M.K., Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* (2011): <https://doi.org/10.1002/bdrc.20206>

⁷ HARPER, C., LAWRENCE, C., The Laboratory Zebrafish (2010) CRC Press ISBN 9781439807439 - CAT# K10378

⁸ RAMSAY, J. M., WATRAL, V., SCHRECK, C. B., & KENT, M. L., Pseudoloma neurophilia infections in zebrafish *Danio rerio*: Effects of stress on survival, growth, and reproduction. *Diseases of Aquatic Organisms* (2010): <https://doi.org/10.3354/dao02145>

⁹ COLLYMORE, C., TOLWANI, R. J., RASMUSSEN, S., The behavioral effects of single housing and environmental enrichment on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* (2015)

¹⁰ LIDSTER, K., READMAN, G.D., PRESCOTT, M.J., OWEN, S.F., International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research. *Journal of Fish Biology* (2017): <https://doi.org/10.1111/jfb.13278>; TYE, M., RIDER, D., DUFFY, E.A., SEUBERT, A., LOTHERT, B., SCHIMMENTI, L.A., Nonhatching decapsulated *artemia* cysts as a replacement to *artemia* nauplii in juvenile and adult zebrafish culture. *Zebrafish* (2015): <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1031>

¹¹ SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C., The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* (2008): <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>

¹² PARICHY, D. M., The natural history of model organisms: Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *eLife* (2015): <https://doi.org/10.7554/eLife.05635.001>

¹³ SPENCE, R., ASHTON, R., SMITH, C., Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Behaviour* (2007): <https://doi.org/10.1163/156853907781492726>

¹⁴ NASIADKA, A., CLARK, M. D., Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR Journal* (2012): <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161>

conocimiento de los requerimientos y necesidades relativas al bienestar, permitiendo la traslación de los experimentos entre los distintos laboratorios. Así se están empezando a publicar las recomendaciones para el uso de pez cebra, mucho más allá de lo que especifica la legislación, detallando rangos de los parámetros, protocolos de transporte, eutanasia y mantenimiento¹⁵. Aun así, aún queda mucho trabajo en cuanto a la gestión de la gran cantidad de líneas, modificadas genéticamente, que se han de manejar y los problemas asociados a la endogamia de las mismas.

Aplicación práctica: la comunicación y el personal.

El bienestar animal al final ha de ser aplicado por el personal que está en contacto con los peces, lo que engloba tanto a los cuidadores, como los investigadores y al responsable de bienestar animal. Sin la implicación de estos tres colectivos no se podría realizar todo el trabajo explicado anteriormente. Normalmente los cuidadores que se encuentran en contacto directo con los animales, perciben alguna alteración en el bienestar de los peces y avisan al responsable de bienestar animal que será el encargado de buscar distintas opciones, si las hubiese y proponérselas al investigador que es el responsable del animal y de la investigación subyacente. Para que este proceso sea eficaz la comunicación ha de ser directa y lo más temprana y rápida posible, a fin de evitar el malestar de los peces y permitir el desarrollo normal de las investigaciones.

Referencias

- ALI, S., CHAMPAGNE, D.L., SPAINK, H.P., RICHARDSON, M.K., Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* (2011): <https://doi.org/10.1002/bdrc.20206>
- COLLYMORE, C., TOLWANI, R. J., RASMUSSEN, S., The behavioral effects of single housing and environmental enrichment on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* (2015)
- HARPER, C., LAWRENCE, C., *The Laboratory Zebrafish* (2010) CRC Press ISBN 9781439807439 - CAT# K10378
- JOHANSEN, R., NEEDHAM, J. R., COLQUHOUN, D. J., POPPE, T. T., & SMITH, A. J., Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* (2006): <https://doi.org/10.1258/002367706778476451>
- KINTH, P., MAHESH, G., & PANWAR, Y., Mapping of zebrafish research: A global outlook. *Zebrafish* (2013): <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0854>
- KIRK, R.G.W., Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Science Technology and Human Values* (2018): <https://doi.org/10.1177/0162243917726579>
- LIDSTER, K., READMAN, G.D., PRESCOTT, M.J., OWEN, S.F., International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research. *Journal of Fish Biology* (2017): <https://doi.org/10.1111/jfb.13278>
- LUND, V., MEJDELL, C. M., RÖCKLINSBERG, H., ANTHONY, R., HÅSTEIN, T., Expanding the moral circle: Farmed fish as objects of moral concern. *Diseases of Aquatic Organisms* (2007): <https://doi.org/10.3354/dao075109>
- NASIADKA, A., CLARK, M. D., Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR Journal* (2012): <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161>
- PARICHY, D. M., The natural history of model organisms: Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *ELife* (2015): <https://doi.org/10.7554/eLife.05635.001>
- RAMSAY, J. M., WATRAL, V., SCHRECK, C. B., & KENT, M. L., Pseudoloma neurophilia infections in zebrafish *Danio rerio*: Effects of stress on survival, growth, and reproduction. *Diseases of Aquatic Organisms* (2010): <https://doi.org/10.3354/dao02145>
- SPENCE, R., ASHTON, R., SMITH, C., Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Behaviour* (2007): <https://doi.org/10.1163/156853907781492726>

¹⁵ <http://www.felasa.eu/working-groups/working-groups-present/zebrafish-housing-husbandry-and-health-monitoring-recommendations/>

- SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C., The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* (2008): <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- TYE, M., RIDER, D., DUFFY, E.A., SEUBERT, A., LOTHERT, B., SCHIMMENTI, L.A., Nonhatching decapsulated artemia cysts as a replacement to artemia nauplii in juvenile and adult zebrafish culture. *Zebrafish* (2015): <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1031>
- <http://www.felasa.eu/working-groups/working-groups-present/zebrafish-housing-husbandry-and-health-monitoring-recommendations/>
- Eurobarómetro 442 sobre el bienestar animal (2015)
- Directiva 2010/63/UE
- Real Decreto 53/2013