

LA INDUCCIÓN DE DIABETES EN LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Deontología y Veterinaria Legal

2012-2013



Sandra Monzón Domènech

Laura Alberto Giner

Clara Farré Esteve

ÍNDICE

1.	CONCEPTO DE DIABETES MELLITUS.....	3
2.	LEGISLACIÓN EN LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	27
3.	EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	37
4.	COMITES ÉTICOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	44
5.	ALTERNATIVAS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	55
6.	COMPARATIVA DE CIFRAS EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	57
7.	PLANTILLA DE LA ENCUESTA POBLACIONAL	66
8.	RESULTADOS GENERALES DE LA ENCUESTA POBLACIONAL	69
9.	RESULTADOS DERIVADOS/CONCLUYENTES DE LA ENCUESTA POBLACIONAL	71
10.	ENTREVISTAS PERSONALES	79
11.	CONCLUSIONES	94
12.	BIBLIOGRAFIA	98

1. CONCEPTO DE DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es el grupo de enfermedades o síndromes metabólicos caracterizados por la aparición de hiperglucemia secundaria a defectos de la secreción de insulina, de la acción de la insulina o ambas.

En el concepto de DM debemos tener presente que la duración de la hiperglucemia y su gravedad son los factores más importantes en la aparición a medio y largo plazo de complicaciones de muy diverso índole. Aunque hay una afectación universal del organismo, las manifestaciones clínicas más evidentes son las siguientes: pérdida de visión que puede llegar a ceguera, afectación renal que puede llegar a insuficiencia renal terminal que precise hemodiálisis y trasplante renal, afectación de los grandes vasos que puede condicionar patologías tan importantes como la insuficiencia arterial de extremidades inferiores que terminaría en la amputación a diversos niveles, cardiopatía isquémica con infarto de miocardio como manifestación más frecuente y, por supuesto, también un incremento de la enfermedad vascular cerebral o una mayor incidencia de enfermedad isquémica intestinal. Sin embargo, el grupo de complicaciones más prevalentes son las que acontecen en el sistema nervioso, tanto en el sistema nervioso periférico como en el autonómico e incluso en el central.

Podríamos adjetivar a la DM como la enfermedad universal, en el sentido de que ninguna célula de nuestro organismo escapa de la alteración metabólica. Así, la falta de acción insulínica, sea de la etiología que sea, inducirá una mala utilización de la glucosa que dará lugar, sobre todo, a la tríada clásica de poliuria, polidipsia y polifagia, pero, junto a estos síntomas, existirá un espectro clínico muy amplio que puede ir desde manifestaciones puramente catabólicas como la pérdida de peso, a otras que son la consecuencia de la afectación progresiva de los diferentes órganos y aparatos. De esta forma, la pérdida progresiva de visión, la aparición de hipertensión arterial o el dolor isquémico i neuropático de las extremidades, entre otros, son manifestaciones comunes en la DM.

Conforme disminuye la acción insulínica y aumenta la hiperglucemia, superando el dintel renal de reabsorción de glucosa, la clínica de la enfermedad se hace patente y el paciente notará lo que conocemos como síntomas cardinales de la DM, poliuria, polidipsia y polifagia, pero, conceptualmente, tenemos que tener claro que, hasta que esto ocurre, sobre todo, en la DM tipo 2, hay n periodo más o menos largo (5 a 10 años o más) de hiperglucemia “asintomática”, en la que el paciente también queda expuesto a la aparición de complicaciones crónicas de la DM.

La DM sin tratamiento, pero también con tratamiento, es una enfermedad progresiva; existe el control pero no la curación, y, dependiendo la evolución y del grado de control que se consiga de la hiperglucemia, así como de la coexistencia de otros factores, como pueden ser la hipertensión arterial o la dislipemia, se acelerará el deterioro del diabético, agravándose su situación.

El diabético muere, fundamentalmente, por sus problemas cardiovasculares, centrados, sobre todo, en tres procesos, el infarto agudo de miocardio, el accidente vascular cerebral y en la isquemia de extremidades inferiores que desemboca en gangrena y frecuente infección grave.

Pero desde que se inicia el deterioro hasta que llega la muerte, un sin fin de complicaciones pueden hacer su aparición, lo que supone que con el paso de los años, y conforme el control metabólico es peor, la DM se convierte en una enfermedad multiforme, precisando con frecuencia la intervención de numerosos especialistas y obligando al generalista a dedicarle gran parte de su tiempo.

De esta forma, y conforme se va haciendo mayor el número de complicaciones, la calidad de vida del paciente va empeorando a la par que aumenta el deterioro personal, familiar, laboral y social del paciente, incrementándose a su vez el costo de la enfermedad por factores directos e indirectos (Figura 1). En Europa, la DM es responsable del 2,5 al 15% del presupuesto sanitario, lo que demuestra no sólo el elevado número de pacientes sino también el alto coste que genera la enfermedad.



Figura 1. Incremento del gasto y disminución de la calidad de vida en función del tiempo de evolución de la DM y de la aparición y evolución de las complicaciones.

La DM en el niño y adolescente supone un problema añadido; la posible alteración del desarrollo y la afectación psicológica en una etapa tan importante de la vida como ésta puede dejar secuelas irreversibles. Clásicamente, se ha dicho que el niño sería capaz de soportar la hiperglucemia de la DM mejor que el adulto. Es cierto que es infrecuente ver complicaciones crónicas en niños, pero cuando han evolucionado crónicamente mal controlados, sí es frecuente la aparición de complicaciones microangiopáticas ya antes de los 20 años. También es de destacar el progresivo incremento de DM tipo 2 y síndrome metabólico en niños, que de no corregirse hará que el futuro sanitario en materia de DM sea cada vez más complicado.

De igual forma, en la diabética embarazada o en la diabetes gestacional (mujer embarazada a la que le surge la DM durante el embarazo) la morbi-mortalidad infantil es mucho mayor que en la población no diabética, a la par que durante el embarazo y el parto puede haber un empeoramiento de las complicaciones crónicas.

Existen también una serie de DM que aparecen como consecuencia de otras enfermedades en las que se deteriora el metabolismo de la glucosa, bien por pérdida de parénquima pancreático (pancreatitis crónica fibrosante o calcificante) o por la aparición de resistencia a la insulina o coexistencia de una acción glucogenolítica o neoglucogénica.

En definitiva, en la DM nos encontramos ante un proceso multidisciplinar con diferentes categorizaciones patogénicas y clínicas que harán que el tratamiento de un diabético sea muy diferente al de otro, incluyendo en esto la necesidad o no de insulina exógena (en base a la producción endógena de la misma) y la existencia o no de complicaciones de los diferentes órganos y aparatos.

CLASIFICACIÓN DE LA DM Y DE OTRAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

Filiar un paciente de DM suele ser fácil; sin embargo, establecer el tipo y etiología del proceso es más complicado, pues nos podemos encontrar ante distintos momentos evolutivos de una enfermedad o ante la influencia de determinados fármacos, situaciones que pueden alterar el metabolismo hidrocarbonado en el rango de DM, para posteriormente, si desaparecen, provocar la normalización glucémica.

En junio de 1997, tras 2 años de trabajo de una comisión formada por expertos de la OMS y de la American Diabetes Association (ADA), se dieron a conocer los nuevos criterios clasificatorios que quedaron reducidos a 4 grupos:

DM tipo 1

Tipo de DM en el que la destrucción de las células β del páncreas conducen a una deficiencia absoluta de insulina. Representa entre el 5-10% de la DM y engloba a los antiguos conceptos de diabetes infanto-juvenil o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID). Se reconocen 2 subtipos:

1. **DM mediada por inmunidad**: Esta forma, que representa el 95% de la DM tipo 1, aparece como consecuencia de una destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Ya en fases precoces de la enfermedad, cuando todavía no hay criterios diagnósticos de DM, pero sí de otras anomalías del metabolismo de la glucosa, aparecen en sangre diferentes tipos de anticuerpos, unos dirigidos contra las propias células, otros contra la insulina o también contra la descarboxilasa del ácido glutámico o contra las tirosin-fosfatasas. Estos anticuerpos, 1 o más, aparecen ya en fase de alteración de la glucemia en ayunas.

Estos pacientes, en su mayoría, desarrollan su enfermedad antes de los 25 años de edad, con igual presentación en ambos sexos y diferente incidencia según raza y hábitat geográfico. Así, la DM tipo 1 es más frecuente en blancos y en países nórdicos de Europa. Conocemos hoy su frecuente asociación con determinados patrones de histocompatibilidad. El complejo HLA-DR/DQ puede mostrar diferentes subtipos, unos protectores y otros predisponentes.

La velocidad de aparición de la enfermedad es muy variable y va a depender de la velocidad de destrucción de las células β . En niños y adolescentes la destrucción de las células β suele ser rápida, de tal forma que los síntomas cardinales, poliuria, polidipsia y polifagia, aparecen de forma abrupta en pocos días o semanas, induciendo con

frecuencia la aparición de una grave complicación aguda de la DM que es la cetoacidosis diabética. En otros casos, la destrucción es lentamente progresiva; esto ocurre sobre todo en adultos y hace que el debut de la diabetes se asemeje al de una DM tipo 2, es la conocida como DM tipo LADA (latent autoimmune diabetes in adults).

2. DM idiopática: En la actualidad todavía hay algunas formas de DM tipo 1 en las que desconocemos su etiología y que comportan este grupo. No presentan anticuerpos conocidos ni asociaciones con la HLA. Son más frecuentes en personas enraizadas en África o Asia. Clínicamente, la insulinemia es muy fluctuante por lo que hay tendencia a frecuentes episodios de cetoacidosis.

DM tipo 2

Es el tipo más frecuente, del 90 a 95% de las personas con DM. Patogénicamente, se caracteriza por la presencia de resistencia a la acción periférica de la insulina, secreción de insulina defectuosa o ambas. En el momento del diagnóstico suele haber una mezcla de ambas alteraciones y, etiológicamente, lo característico es la multifactorialidad con ausencia de destrucción autoinmune de las células β (Figura 2).

La obesidad abdominal está presente en más de un 85% de los diabéticos tipo 2, siendo éstos precisamente los que entroncan, habitualmente, con el diagnóstico de síndrome metabólico y, por tanto, con la resistencia a la insulina como elemento fundamental en su patogenia. Estos componentes tienen una carga genética importante, pero sin el concurso de factores de medio ambiente, sobre todo, del sedentarismo, no ponen en marcha los mecanismos que provocan la aparición clínica del cuadro. Tanto es así que, aunque cada vez menos por el estilo de medicina preventiva que va imperando, se calcula que casi un 50% de estos pacientes están sin diagnóstico por la escasez de síntomas que presentan.

La aparición de cetoacidosis no excluye el diagnóstico de DM tipo 2, si bien en estos casos debe existir un factor precipitante que incremente la demanda de acción insulínica, lo que ocurre en infecciones, intervenciones quirúrgicas o situaciones muy estresantes, entre otros.

Mientras el páncreas mantiene una secreción de insulina suficiente para vencer la resistencia insulínica, el diabético tipo 2 se mantiene en situación funcional de no insulinodependencia, pero lo habitual es que, con el paso de los años, el páncreas vaya claudicando y la secreción de insulina sea insuficiente para controlar la glucemia, momento en el que el diabético tipo 2 cambia su situación funcional a diabético insulinodependiente, debiendo en cualquier caso contemplar el médico que la insulinización debe hacerse más bien antes que después.

Aunque su diagnóstico se realiza normalmente en la edad adulta (más de 40 años), cada vez la edad de diagnóstico es menor, estando diagnosticándose ya en adolescentes y más raramente en niños con obesidades abdominales importantes y/o gran resistencia a la insulina. En esta DM, la carga genética es importante como lo es en las mujeres haber tenido una diabetes gestacional previa.

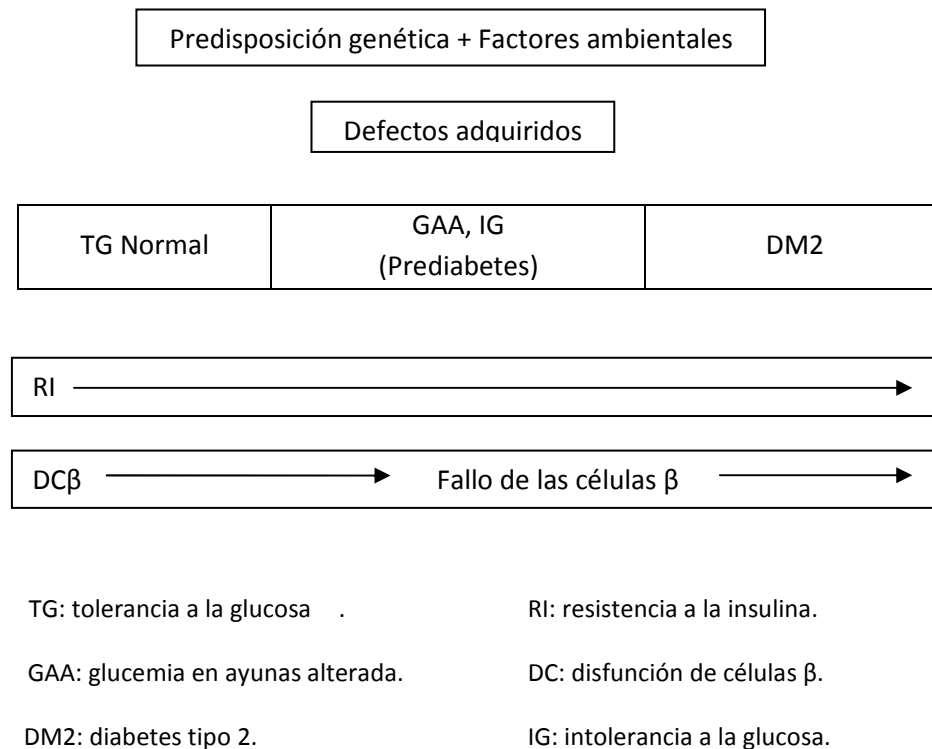


Figura 2. Esquema representativo de los hechos fundamentales implicados en el desarrollo de la diabetes tipo 2.

Otros tipos específicos de DM

Este tercer grupo clasificatorio de la DM reúne una serie de situaciones clínicas con diagnóstico de DM que no tienen relación entre ellas y que, en general, se apartan de la frecuencia e importancia de la DM tipo 1 y tipo 2.

1. **Defectos genéticos de las células β:** Personas habitualmente con menos de 25 años pueden expresar datos diagnósticos de DM que tiene su causa en un mal funcionamiento de las células β, lo que induce un déficit en la secreción de insulina, con mínima o nula repercusión en la acción insulínica. Estas formas de DM recibieron el nombre de diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young). El comportamiento es como en la Dm tipo 2.

La causa de esta alteración es un defecto genético, que se hereda con patrón autosómico dominante. Existen varias formas de MODY y en ellas se implican diferentes cromosomas.

- MODY 1: se produce por alteración del gen HNF-4α (HNF es el factor nuclear del hepatocito) en el cromosoma 20. HNF-4α es un factor de transcripción involucrado en la regulación y expresión de HNF-12.
- MODY 2: se produce por la alteración del gen de la glucocinasa en el cromosoma 7p. Debido a este problema hay una alteración en la función de la glucocinasa, la enzima que convierte la glucosa a glucosa-6-fosfato. Realmente

a la glucocinasa se le ha denominado enzima “glucosensora” para la célula β y cuando esta enzima no actúa adecuadamente, es necesario que aumenten los niveles de glucosa para obtener niveles normales de secreción insulínica.

- MODY 3: se produce por la mutación del gen HNF-1 α en el cromosoma 12. Es el tipo más frecuente de todos.
- MODY 4: se produce por la mutación del gen de IPF-1 en el cromosoma 13. IPF-1 es un factor promotor de insulina. Esta rara forma tiene la particularidad de que en su forma homocigota existe agenesia pancreática.

Otras formas todavía más infrecuentes se han descrito recientemente. La mutación en el ADN mitocondrial es una alteración que puede encontrarse unida o no a DM. Otras alteraciones son la falta de conversión de proinsulina a insulina que también se hereda de forma autosómica dominante o la secreción de insulinas mutadas que son biológicamente inactivas.

2. Defectos en la acción de la insulina de etiología genética: son causas infrecuentes de DM y están determinadas por alteraciones del receptor o a nivel postreceptor, que en función de su gravedad darán lugar a modestas hiperglucemias acompañadas de hiperinsulinemia, pero que, a veces, llegan a producir hiperglucemias graves. Los cuadros clínicos mejor conocidos asociados a estas alteraciones son:

- El antes llamado tipo A de resistencia a la insulina y que hoy en día podría considerarse como un subtipo de Síndrome del Ovario Poliquístico; es un cuadro en el que la mujer presenta poliquistosis ovárica, androgenismo, acantosis nigricans y resistencia a la insulina.
- El leprechaunismo o síndrome de Donohue es una alteración genética que se hereda de forma autosómica recesiva, que clínicamente cursa con bajo peso y talla al nacer, malformaciones craneofaciales, aumento de tamaño de pene/clítoris, lipoatrofia y resistencia a la insulina. Es el más grave de los síndromes de resistencia a la insulina por afectación del receptor de insulina y los niños afectados mueren precozmente.
- El síndrome de Rabson-Mendenhall es uno más de los cuadros debidos a alteraciones del receptor de insulina. Es de muy rara aparición y de menor gravedad que el anterior.

3. Enfermedades del páncreas exocrino: numerosos son los procesos exocrinos que, aconteciendo sobre el páncreas, pueden llegar a afectar el páncreas endocrino y producir DM. Los más conocidos son las pancreatitis, en especial, la aguda necrótico-hemorrágica y la crónica calcificante, algunos traumatismos graves que incidan sobre el área pancreática, las infecciones tipo colecisto-pancreatitis, las pancreatectomías totales o casi totales y el cáncer de páncreas.

4. Endocrinopatías: la aparición de concentraciones anormales de hormonas contra-insulares del tipo de la hormona de crecimiento, glucagón, cortisol o catecolaminas

antagonizan la acción insulínica, dando lugar a hiperglucemia y DM. Así, la acromegalia, el glucagonoma, el síndrome de Cushing y la feocromocitoma, entre otras, son enfermedades que en su cuadro clínico llevan la posibilidad de DM. Esta DM desaparece con el control de la enfermedad o de su hiperproducción hormonal.

5. Inducida por fármacos u otras sustancias químicas: Lo que estas sustancias hacen es precipitar la manifestación de alteraciones ya existentes, bien en forma de disfunción secretora o de insulino-resistencia. Otras actúan directamente destruyendo las células β . Algunas de estas sustancias o fármacos que pueden inducir diabetes por este mecanismo son el ácido nicotínico, glucocorticoides, hormonas tiroideas, y agonistas α y β adrenérgicos.
6. Infecciones: ciertos virus se han asociado a la destrucción de las células β y se han localizado, incluso, en el páncreas de pacientes que han muerto en el transcurso del debut de la enfermedad. La diabetes acontece en algunos niños con rubéola congénita; también se ha relacionado con parotiditis, virus coxsackie B o citomegalovirus, entre otros.
7. Formas infrecuentes de diabetes mediada por inmunidad: en este apartado hay dos entidades bien conocidas:
 - Síndrome del hombre rígido: se caracteriza por una afectación del SNC en la que el paciente desarrolla de forma progresiva espasticidad muscular acompañada de paroxismos espasmódicos y dolorosos. Además, los pacientes suelen tener anticuerpos anti-GAD positivos y un tercio de ellos desarrollan diabetes.
 - Anticuerpos anti-receptor de insulina: bloquean la acción insulínica al impedir la unión de la insulina a su receptor, mecanismo por el que inducirían hiperglucemia. Pero independientemente pueden producir hipoglucemia como consecuencia de su unión al receptor. Cuando el estado de resistencia a la insulina es muy pronunciado cursan con acantosis nigricans.
8. Otros síndromes genéticos a veces asociados a diabetes: estos síndromes entre otros a veces se acompañan de DM:
 - Down: trisomía 21.
 - Klinefelter: hipogonadismo primario por 47XXY.
 - Turner: hipogonadismo por 45X0.
 - Wolfram: diabetes mellitus, diabetes insípida, atrofia óptica y sordera neurológica.
 - Ataxia de Friedreich.
 - Corea de Huntington
 - Laurence-Moon-Biedl-Rozabal.

- Prader Willi.
- Distrofia miotónica.

Diabetes mellitus gestacional

Es la aparición de intolerancia a la glucosa e hiperglucemia de gravedad variable que específicamente no debe ser conocida antes del embarazo y debe manifestarse y ser diagnosticada durante el mismo. Esto no excluye que la paciente ya tuviese la intolerancia antes del embarazo, pero, en cualquier caso, no había sido diagnosticada.

También este concepto es diferente al de “diabética embarazada”, es decir, mujer portadora de diabetes tipo 1 o 2, ya diagnosticada y, habitualmente, en tratamiento, que queda embarazada.

Durante el primer trimestre de gestación, la glucemia suele ser normal o más baja de lo habitual. La aparición de hiperglucemia en esta fase del embarazo debe hacer pensar en que la mujer ya era portadora de la alteración metabólica antes de quedar embarazada. Un test normal de sobrecarga oral de glucosa en estos primeros meses de embarazo no excluye la aparición posterior de DM gestacional.

El perfil de mujer con riesgo de DM gestacional es: mujer añosa, historia previa de intolerancia a la glucosa, fetos y niños con macrosomas previos, obesidad central, glucemia anormal en ayunas o pertenencia a determinados grupos étnicos como hispano-americanos, afro-americanos, asiático-americanos, indios Pima o nativos de las islas del pacífico.

La DM gestacional por sí misma constituye un factor de riesgo para desarrollar posteriormente la DM tipo2.

FACTORES DE RIESGO DE DIABETES TIPO 1

Hay múltiples posibles factores de riesgo de DM1. El más destacable es la historia familiar de DM1. El riesgo que confiere tener un familiar de primer grado con esta enfermedad es diferente dependiendo del tipo de parentesco. Así, la concordancia es máxima para hermanos gemelos univitelinos (33% de concordancia), seguida de la de hermanos idénticos para HLA* (15% de concordancia), tener el padre con DM1 (8% de concordancia) o tener madre o un hermano con DM1 (5% de concordancia). En cuanto a factores ambientales, se ha detectado un mayor riesgo de DM1 asociado a factores como bajo peso al nacer, corta duración o ausencia de lactancia materna, introducción precoz de alimentación con albúmina bovina, tratamiento con suplementos de vitamina D, diversos tipos de vacunaciones, el estrés psicológico, la talla elevada, el exceso de peso, la dieta con un alto contenido en nitritos, la mayor edad materna y la incompatibilidad Rh materno-fetal (Figura 3). De todos ellos, el más consistente es el factor protector que supone para DM1 la lactancia materna.

En cuanto a la distribución por sexo y edad en DM1 se puede decir que por sexos no muestra diferencias hasta los 14 años. En cambio, a partir de la pubertad suele observarse un

predominio de varones afectados. La mayoría de registros europeos con incidencias medias-altas encuentran una relación varón/mujer de 3/2, en el grupo de 15-40 años. De hecho, la diabetes mellitus tipo 1 es la única enfermedad autoinmunitaria que no es más frecuente en las mujeres.

Iniciadores	Promotores y/o precipitantes
Infecciones virales prenatales: rubéola	Infecciones de repetición (virus) durante el embarazo
Incompatibilidad de grupo sanguíneo: Coxackie B4, grupo sanguíneo materno-fetal	Ciertos ingredientes alimentarios (niburaminas)
Proteína de la leche de vaca +	Pubertad
Nitrosaminas +/- (aditivos a alimentos)	Crecimiento acelerado
Nitritos/nitratos +/- (agua potable)	Stress psicológico maternal
	Tabaquismo en entrono familiar

Figura 3. Factores ambientales. Tipo de riesgo de DM tipo 1.

FACTORES DE RIESGO DE DIABETES TIPO 2

Los marcadores de riesgo de DM2 son la edad avanzada (la prevalencia de DM2 va aumentando con la edad hasta la sexta y séptima décadas, seguida de una posterior reducción en los más ancianos), la obesidad, la historia familiar de diabetes, la raza, el nivel socioeconómico y el estilo de vida occidental (refiriéndose principalmente a la obesidad, dieta e inactividad física). Cada uno de ellos es probablemente un reflejo de los factores causales subyacentes. En la historia natural de la DM2 se describe un estado previo de intolerancia a la glucosa y de glucemia basal alterada, estados que confirman que el riesgo de desarrollar DM2 aumenta cuanto mayor es el nivel de glucemia.

Muchos estudios confirman el papel de los factores fisiológicos y de estilo de vida en la etiología de la DM2. Tales factores incluyen, en primer lugar, a la obesidad, que se acompaña de resistencia a la insulina. La duración prolongada de la obesidad y la presencia de obesidad central, detectada por un mayor perímetro de cintura, también se han asociado a una mayor incidencia de DM2. Más polémica es la cuestión de si la dieta en sí misma precipita la diabetes independientemente de la obesidad. Los estudios recientes sugieren que hay cambios importantes en la tolerancia a la glucosa con el cambio de la dieta tradicional a la occidental y viceversa. Otros estudios describen los efectos protectores de una dieta rica en fibra, cereales integrales, frutas y verduras, o incluso, y aunque parezca paradójico, el efecto protector del consumo moderado de alcohol, o mayor riesgo ante niveles plasmáticos bajos de vitamina E.

La inactividad física también desempeña un importante papel en el riesgo de presentación de intolerancia a la glucosa y DM2. Diversos estudios epidemiológicos han relacionado positivamente el sedentarismo con el riesgo de DM2.

Recientes estudios en Europa y Estados Unidos han descrito que el bajo peso al nacer y otras alteraciones del crecimiento fetal en neonatos a término estarían asociadas con mayor prevalencia de intolerancia a la glucosa y consiguiente DM2. Los mecanismos se desconocen, pero parece ser que existirían alteraciones del desarrollo neuroendocrino del feto. Estas alteraciones hormonales contribuirán a la predisposición a la diabetes y al síndrome metabólico. También es esta línea, el tratamiento de niños y adolescentes con hormona de crecimiento se ha descrito como acelerador de la presentación de la DM2 en individuos predispuestos.

MORTALIDAD POR DIABETES

La hiperglucemia en sí misma se asocia a un incremento de la mortalidad, que es mayor cuanto más elevado es el nivel de glucemia basal. A su vez, la edad, la hipertensión y la presencia de proteinuria también están independientemente asociadas al incremento de mortalidad por cualquier causa en la DM2.

En los Estados Unidos se estima que los fallecimientos de personas con DM2 suponen el 15-20% de todas las muertes en la población mayor de 25 años. La tasa de mortalidad es 2 a 3 veces superior en pacientes cuyo diagnóstico de la enfermedad se realiza después de los 40 años. En la mayoría de los países desarrollados, la diabetes ocupa del 4º al 8º lugar entre las causas de defunción. En los países europeos, la tasa de mortalidad oscila entre 8 y 33 por cada 100.000 habitantes, siendo España actualmente del orden de 23 por cada 100.000. En la mayor parte de los estudios, las tasas de mortalidad son superiores para las mujeres que para los hombres (en España, 29 frente a 16 por 100.000).

La estimación de la mortalidad por diabetes se obtiene a través de certificados de defunción. Se ha cuestionado la fiabilidad del método, ya que, en general, en un gran porcentaje de los certificados no se registra la diabetes como causa de muerte. La diabetes aparece en España como la tercera causa de muerte en mujeres (después de las enfermedades cardiovasculares y la isquemia cardíaca) y la séptima en varones. Es evidente que este rango se debería corregir en función del papel que desempeña la diabetes como causa predisponente de enfermedad cardiovascular o coronaria. Por provincias, el exceso de mortalidad por DM en España presenta una agregación geográfica en el sur, sureste y provincias insulares.

En los últimos años se ha podido documentar un importante descenso de la tasa de mortalidad por diabetes en España. Este descenso es lógico, si se consideran las mejoras aplicadas al manejo de los factores de riesgo cardiovascular en la diabetes, así como a la optimización del control metabólico y, la prevención de las complicaciones crónicas de la enfermedad.

PREVENCIÓN DE LA DIABETES

La DM2 está aumentando en los últimos años, en parte como consecuencia del aumento de la obesidad, el sedentarismo y cambios en los hábitos dietéticos. Estos factores de riesgo son claramente modificables, por lo que si se consigue disminuir la prevalencia de obesidad, aumentar la actividad física de la población de riesgo y mejorar los hábitos alimentarios, se

podría prevenir de forma importante la DM2. En este sentido, varios ensayos clínicos han demostrado contundentemente la eficacia de la dieta equilibrada y la actividad física moderada en la prevención de la DM2. Evidentemente no es fácil trasladar las condiciones del ensayo clínico a la realidad mediante iniciativas de salud pública, y actualmente se estudia el coste y la efectividad de las posibles medidas encaminadas a la prevención de la DM2. Las recientes iniciativas encaminadas a conseguir un tratamiento integral de la obesidad como problema sanitario, incluyendo políticas educativas en la edad escolar, de incentivación de la actividad física, implicando a la industria alimentaria e, incluso, estrategias urbanísticas, pueden ser muy efectivas para intentar atajar una de las grandes epidemias del siglo XXI.

CLÍNICA DE LA DIABETES TIPO 1

La destrucción continuada de las células β comporta una progresiva pérdida de la reserva de insulina hasta establecerse finalmente el estado de absoluta deficiencia de insulina. Los síntomas cardinales de la DM1 son atribuibles a la hiperglucemia de días o semanas de evolución. En concreto son: poliuria (puede manifestarse como enuresis secundaria en el caso de niños), polidipsia, polifagia, astenia y pérdida de peso. Estos pacientes suelen ser delgados o tener un peso normal.

En el pasado, la forma de presentación de esta entidad era repentina y grave y, en general, se producía durante la infancia o edad adulta temprana. En la mayoría de los casos se trataba de jóvenes de menos de 20 años en el momento del diagnóstico y se presentaba en forma de cetoacidosis diabética (CAD). La CAD representa una de las complicaciones metabólicas agudas más graves propia de la DM1 causada por un déficit relativo o absoluto de insulina y un incremento concomitante de las hormonas contrainsulares. Se caracteriza por un notable trastorno catabólico en el metabolismo de los carbohidratos, las proteínas y los lípidos, u se presenta clásicamente con la tríada: hiperglucemia, cetosis y acidosis metabólica. Datos más recientes sugieren que sólo el 50-60% de los pacientes con DM1 tienen menos de 16-18 años en el momento de presentación y que el debut se precede de un largo periodo de pródromos donde la homeostasis de la glucosa es normal o está levemente alterada.

Tras empezar el tratamiento con insulina, puede aparecer el denominado periodo de luna de miel o remisión parcial. Este hecho es debido a la disminución del efecto glucotóxico y lipotóxico sobre la función β y la sensibilidad a la insulina. Este periodo puede durar desde pocos meses hasta incluso varios años presentando bajas necesidades de insulina y un fácil control metabólico.

CLÍNICA DE LA DIABETES TIPO 2

La resistencia a la insulina, factor fundamental en el desarrollo de la DM2, se asocia a otros factores, es especial, la obesidad. Así, el 80-90% de los pacientes con DM2 son obesos. Es precisamente el aumento, de momento imparable, de la obesidad en casi todas las poblaciones humanas, la causa de que en la actualidad se superen los 150×10^6 de individuos afectados de esta enfermedad y que se presuma un aumento del doble hacia el año 2025. En este contexto es importante destacar que en los últimos años, la DM2 ha pasado de

considerarse una enfermedad casi exclusiva de los adultos a ser una entidad que también aparece durante la infancia y adolescencia.

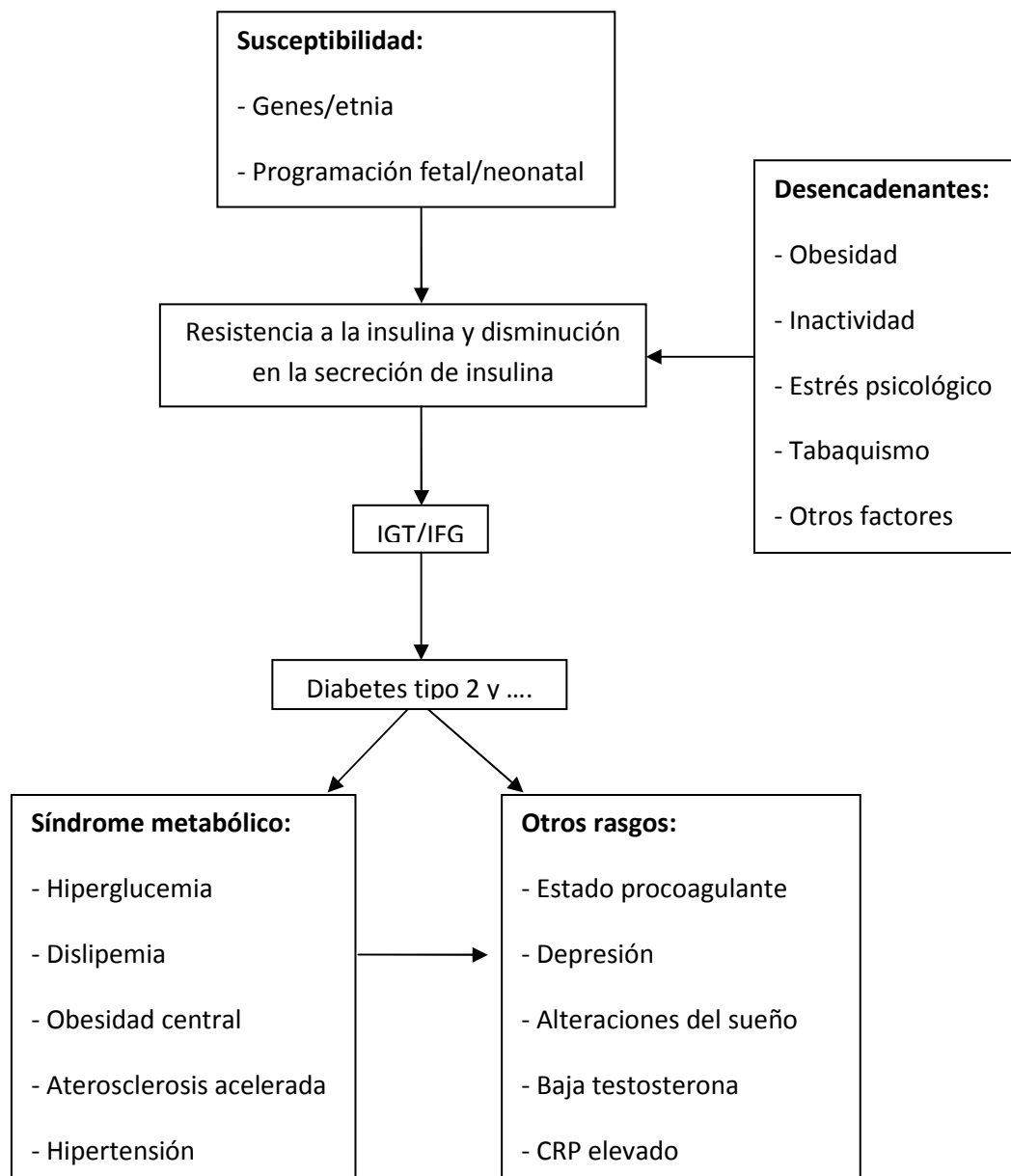


Figura 4. Modelo para el desarrollo de la DM2. La diabetes y síndrome metabólico se desarrollan cuando factores ambientales, como la obesidad, causan resistencia a la insulina y empeoramiento de la secreción de insulina en individuos genéticamente susceptibles. IGT/IFG: intolerancia a la glucosa/intolerancia basal a la glucosa.

Cabe mencionar que la mayor parte de los casos de DM2 se producen en el contexto del llamado síndrome metabólico (SM). El SM es una entidad clínica controvertida que aparece, con amplias variaciones fenotípicas, en personas con una predisposición endógena, determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales. Se caracteriza por la

presencia de insulinoresistencia e hiperinsulinismo compensador asociados a trastornos del metabolismo hidrocarbonado, cifras elevadas de presión arterial, alteraciones lipídicas (hipertrigliceridemia, descenso del cHDL, presencia de LDL tipo B, aumento de ácidos grasos libres y lipemia postprandial) y obesidad, con un incremento de la morbimortalidad de origen aterosclerótico (Figura 4).

La clínica cardinal de la DM2 (debilidad, poliuria, polidipsia, etc.) se presenta frecuentemente de forma insidiosa a lo largo de semanas o meses. Incluso es frecuente el hallazgo casual de hiperglucemia en pacientes asintomáticos. Este es en realidad el gran problema de la DM2, ya que se diagnostica con varios años de retraso. De hecho, se considera que, en el momento del diagnóstico, la función pancreática es aproximadamente del 50%, disminución que se inicia probablemente 10-12 años antes del diagnóstico. Debido a esta demora en el momento de diagnóstico, hasta en un 20% de los casos presentan alguna complicación crónica y, aproximadamente, un 50% de las personas con DM2 no han sido diagnosticadas. Este hecho realza la importancia de instaurar políticas de diagnóstico precoz en población de alto riesgo.

ACTITUD ANTE EL DEBUT DE UNA DIABETES MELLITUS

El diagnóstico de diabetes mellitus (DM) constituye un momento crítico en la vida del paciente y es fundamental que tanto el médico como su equipo proporcionen de forma rápida y efectiva asistencia médica e información suficiente para que el paciente pueda hacer frente a esta nueva situación.

La diabetes es sin duda la enfermedad crónica que requiere más diálogo entre el paciente y los profesionales de la salud; al contrario que en otras enfermedades, los pacientes pueden tomar decisiones importantes relativas al tratamiento de su diabetes. La experiencia del equipo médico es importante, pero el conocimiento del paciente, su dedicación y su iniciativa para pedir ayuda cuando lo considere necesario serán los factores más significativos y decisivos para manejar de forma óptima su diabetes, impidiendo que pequeños problemas se conviertan en situaciones graves.

En la consulta inicial, el primer paso lógico será llevar a cabo una historia médica detallada, examen físico y analíticas de sangre y orina. Es, sin duda, el momento para calmar la ansiedad del paciente (y su familia) y mostrarle que no está sólo ante su enfermedad y que tendrá un equipo de profesionales dispuesto a ayudarlo, informarle para que pueda llevar a cabo una vida normal y también evitar el desarrollo de complicaciones secundarias a su diabetes. El paciente (y su familia) deberán llevar a cabo un proceso significativo de adaptación y poner en marcha una serie de mecanismos psicológicos compensadores para afrontar la nueva situación de salud. El paciente debe entender que el tratamiento de su diabetes estará basado en un enfoque interdisciplinar (enfermera educadora, dietista, médico). Su motivación y capacidad para cuidarse, acompañado de una línea de comunicación óptima, en forma de llamadas de teléfono, envío de datos de forma electrónica y visitas a la consulta, serán factores decisivos de cara a desarrollar un plan terapéutico eficaz.

PERSPECTIVA GENERAL DEL TRATAMIENTO

El tratamiento de los pacientes con DM consiste en: educación sobre pautas de estilo de vida saludable, evaluación de la posibilidad de complicaciones micro y macrovasculares, normalización de la glucemia, reducción de los factores de riesgo cardiovasculares y omisión de fármacos que pueden agravar las anomalías del metabolismo insulínico y lipídico. La DM2 presenta en su historia natural una serie de transformaciones en su fisiopatología, por lo que resulta imprescindible que adaptemos el tratamiento a su curso evolutivo.

Con respecto al control de la glucemia el objetivo es: mantener una glucemia que evite la cetosis, con la intención de obtener una glucemia preprandial de 110 mg/dl o postprandial de 180 mg/dl, evitando la aparición de hipoglucemias.

Educación diabetológica

Los pacientes con DM deben recibir educación diabetológica a partir del momento del diagnóstico de su enfermedad y este apoyo educacional debe ser parte integral del programa de tratamiento de su DM. Los cambios en el comportamiento llevados a cabo por el paciente son la clave del éxito de la educación diabetológica y deben medirse y controlarse como parte del cuidado médico. La educación diabetológica debe incluir temas psicosociales, porque sentirse bien se asocia fuertemente con resultados positivos en el control de la diabetes.

La evaluación psicosocial y el seguimiento deben incluir, aunque no sólo esto a, conocimientos sobre la enfermedad, expectativas sobre el manejo médico y los resultados, estado de humor, calidad de vida general y asociada a diabetes, recursos (económicos, sociales y emocionales) e historia psiquiátrica. Hay que indagar sobre problemas psicosociales, como depresión, ansiedad, trastornos alimentarios y alteraciones cognitivas cuando la adherencia al tratamiento médico no es apropiada. El asesoramiento de las situaciones psicológicas y sociales debe incluirse en el manejo médico de la diabetes.

Terapia nutricional y actividad física

Es muy importante en el tratamiento de la DM que pautemos unas recomendaciones dietéticas y de actividad física adecuadas con la intención de: combatir el sobrepeso; mantener un estado nutricional adecuado, contribuir a normalizar el control metabólico, contribuir a mejorar el curso de las complicaciones metadiabéticas e interrumpir la progresión de la historia natural de la diabetes. Estas recomendaciones deben ser personalizadas y adaptarse a las posibilidades económicas, preferencias culturales, gustos y tratamiento médico que el paciente recibe.

Cuando hay sobrepeso, y en los individuos obesos con resistencia a la insulina, una leve pérdida de peso ha demostrado reducir la resistencia a la insulina. Así, se recomienda la pérdida de peso ($\approx 7\%$ del peso corporal) a todos los pacientes con sobrepeso o a individuos obesos que padezcan o que tengan riesgo de desarrollar diabetes. La actividad física y las

modificaciones en el comportamiento son factores importantes de los programas de adelgazamiento y son fundamentales a la hora de mantener la pérdida de peso.

Para perder peso, tanto las dietas bajas en carbohidratos se debe controlar el perfil lipídico, la función renal y la ingesta de proteínas (en aquellos con nefropatía) para ajustar la terapia hipoglucemiante.

Controlar los carbohidratos, ya sea contándolos, a través de intercambios o mediante estimaciones basadas en la experiencia, es una clave estratégica importante para conseguir el control glucémico. En los pacientes diabéticos, el uso del índice glucémico puede proporcionar un pequeño beneficio adicional en el control de la glucemia al obtenidocuando únicamente se considera la ingesta total de carbohidratos.

Otras recomendaciones nutricionales aconsejarían limitar el consumo de grasas saturadas a < 7% del total de calorías, debiéndose minimizar la ingesta de grasas trans. Si los adultos con diabetes beben alcohol, la ingesta diaria debe limitarse a una cantidad moderada (1 bebida diaria o menos en las mujeres adultas y 2 bebidas diarias o menos en los hombres adultos). Se recomienda igualmente el consumo de fibra en la dieta (14 g de fibra/1.000 Kcal) y de alimentos que contengan grano entero. Los suplementos con antioxidantes, como la vitamina E y C y los carotenos, no se aconsejan por la falta de evidencia de su eficacia y el desconocimiento de la seguridad a largo plazo. Se debe aconsejar a los pacientes diabéticos actividad física aeróbica de moderada intensidad, al menos, durante 150 minutos/semana (al 50-70% de la frecuencia cardíaca máxima). Si no hay contraindicaciones, debe animarse a los pacientes con DM2 a hacer ejercicios de resistencia 3 veces por semana.

Tratamiento farmacológico

El tratamiento inicial en la mayoría de los pacientes con DM2, además de consejo dietético y actividad física, debe incluir metformina, ya que este tratamiento puede inducir la normoglucemia si el cumplimiento es óptimo. En concreto, La Asociación Americana de Diabetes (ADA) y Sociedad Europea de Diabetes (ESAD) han recomendado que la metformina debería ser iniciada al mismo tiempo que los cambios en el estilo de vida en el momento del diagnóstico de la DM2 si no hay contraindicaciones específicas (por ejemplo, circunstancias que predisponen a la acidosis láctica).

La dosis de metformina debe ir aumentándose hasta la máxima dosis efectiva (generalmente, de 2.000 a 2.500 mg/día en varias dosis) durante 1 o 2 meses, si se tolera. Si hay contraindicaciones se podría considerar una sulfonilurea de corta duración, como terapia inicial, acompañada de cambios en el estilo de vida en el momento del diagnóstico, de cara a contrarrestar la ganancia de peso que, generalmente, se asocia al tratamiento con sulfonilureas.

Después de una respuesta inicial positiva a esta terapia, la mayoría de los pacientes ganan peso y muestran elevaciones de sus perfiles glucémicos y de la HbA1c¹, por lo que requieren una terapia adicional (más agentes orales, combinación de agentes orales e insulina o insulina en monoterapia).

Para pacientes que no toleran o no son candidatos a metformina o sulfonilureas, la repaglinida es una alternativa razonable, sobre todo, en los pacientes con enfermedad renal crónica. Otra terapia alternativa es una tiazolidinediona, que debe ser considerada en los pacientes con valores iniciales bajos de HbA1c o si hay contraindicaciones específicas a las sulfonilureas. Si se usa una tiazolidinediona como terapia inicial, se prefiere la pioglitazona porque hay más datos sobre el perfil lipídico aterogénico y por el posible aumento de riesgo de eventos cardiovasculares con la rosiglitazona. Se puede considerar un inhibidor de la DPP-4², la sitagliptina, como monoterapia en los pacientes intolerantes, o a aquellos en los que la metformina, sulfonilureas o tiazolidinedionas están contraindicadas. Por ejemplo, la sitagliptina podría ser una buena opción como terapia inicial en un paciente con enfermedad renal crónica con riesgo de hipoglucemia.

En el tratamiento con inhibidores de la DPP-4, el peso se mantiene estable, mientras que con los análogos de GLP-1³ se ha demostrado una reducción del mismo.

Según los datos disponibles en la actualidad, el uso de incretinomiméticos o inhibidores de la DPP-4 puede considerarse en:

- Pacientes obesos con DM2 que no se controlan con metformina y/o sulfonilureas y que no desean empezar insulino terapia debido a la probable ganancia de peso y/o al miedo a las hipoglucemias.
- Pacientes obesos con DM2 que tienen una hiperglucemia postprandial grave, como causa principal del mal control diabético.

Los inhibidores de la DPP-4 pueden utilizarse como monoterapia en:

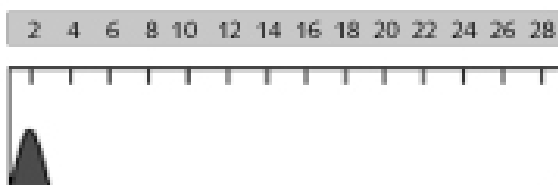
- Pacientes que no deban tomar metformina debido a los efectos adversos o a insuficiencia renal. En la insuficiencia renal puede emplearse sitagliptina ya que existen datos sobre su seguridad.
- Pacientes que no quieren tomar sulfonilureas debido a hipoglucemias frecuentes o ganancia de peso.

Cabe decir, que los antidiabéticos orales no son útiles en situaciones clínicas en las que las necesidades de insulina y el aporte de glucosa varían rápidamente. Podrían tener, tal y como hemos comentado, un papel en diabéticos tipo 2, previamente controlados, ingresados de forma programada y en los que no exista una enfermedad o alteraciones dietéticas que faciliten su descontrol. Es muy importante tener en cuenta que hay que evitar las sulfonilureas por el alto riesgo de hipoglucemia prolongada, la metformina si hay insuficiencia renal o cardíaca por riesgo de acidosis, y las tiazolidinedionas por la retención de líquido si hay insuficiencia cardíaca, renal, hepatopatía, etc.

La insulina también puede ser considerada como primera línea terapéutica en todos los pacientes con DM2, sobre todo, aquellos que presentan: HbA1c > 10%, glucemia en ayunas > 250 mg/dl, determinaciones de glucemia persistentemente > 300 mg/dl o cetonuria.

En cuanto al paciente diabético ingresado el control ideal y aconsejable se debe llevar a cabo con insulina. Se pueden barajar distintas opciones, tanto en el tipo de insulina como en su forma de administración. Conviene, por tanto, conocer los principales tipos de insulina empleados en la actualidad, y las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

- Insulina ultrarrápida (insulina Lispro, insulina Aspart).



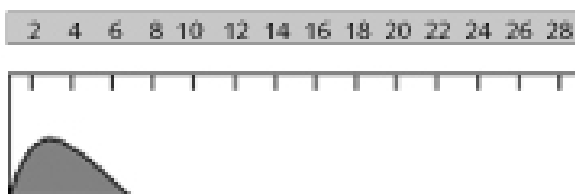
Comienzo: 15 minutos

Pico máximo: 30-70 minutos

Duración: 2-3 horas

Entre sus ventajas, destacan la reducción del aumento postprandial de glucemia y la menor frecuencia de hipoglucemias. No se necesita intervalo de tiempo entre inyección e ingesta (lo que facilita la vida del paciente) y hay una menor diferencia en su absorción según el punto de inyección. Precisa administración de otras insulinas que aporten ritmo insulinémico basal.

- Insulina regular.



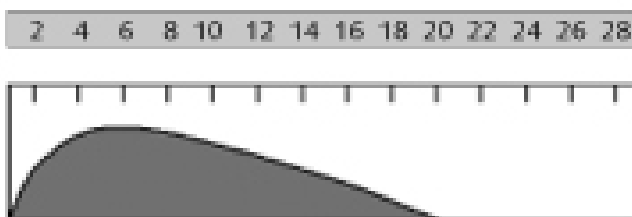
Comienzo: 30 minutos

Pico máximo: 1-3 horas

Duración: 6-7 horas

Es la única insulina que puede administrarse no sólo por vía subcutánea, sino también intravenosa, intramuscular e intraperitoneal; es la de elección en embarazadas y gestantes. Precisa la administración de otras insulinas que aporten ritmo insulinémico basal y debe administrarse 30 minutos antes de las comidas.

- Insulina intermedia (NPH).



Comienzo: 1 hora

Pico máximo: 2-8 horas

Duración: 18-20 horas

La principal ventaja de este tipo de insulina es la amplia experiencia de uso con ella y que consigue mantener niveles sanguíneos de insulina durante más tiempo que las insulinas rápidas. Sin embargo, desde la aparición de insulina glargina, se han hecho evidentes sus principales desventajas, como el riesgo de hipoglucemia y la ausencia de una insulinemia basal uniforme. No suele proporcionar por sí sola niveles adecuados de glucemia, sino que se debe administrar de forma conjunta con otras insulinas rápidas, o bien con antidiabéticos orales.

- Mezclas de insulina (NPH + insulina rápida o ultrarrápida).

Desde la comercialización de la insulina glargina, el uso de las mezclas de insulinas para el tratamiento intensivo de la diabetes es cada vez menor. Prácticamente, la única presentación que continúa en el mercado es la 70/30 (70% de NPH y 30% de insulina rápida). También se dispone de mezclas de NPL con el análogo Lispro o la de NPA con el análogo Aspart. Su principal ventaja es que permite en inyección única, la infusión de dos tipos de insulina. Pero, no es flexible a la hora de variar estas proporciones.

- Insulina ultralenta.



Comienzo: 4 horas

Pico máximo: 8-24 horas

Duración: 28 horas

Sus características son similares a la insulina NPH, pero con una duración de acción mayor. El principal inconveniente de su uso es el riesgo de hipoglucemias. Actualmente, ha sido desplazada casi totalmente en sus indicaciones por la insulina glargina.

- Insulina glargina.



Comienzo: 1 hora

Pico máximo: no tiene

Duración: 24 horas

Su principal ventaja y que la distingue del resto de insulinas es que proporciona niveles basales constantes de insulina, sin causar picos de acción. Se administra cada 24 horas, a cualquier hora del día pero de forma regular, e independientemente de la ingesta. Consigue una eficaz reducción de la HbA1c con mínimo riesgo de hipoglucemias. Sin embargo, al ser una insulina basal, suele ser necesaria la administración conjunta con otras insulinas rápidas, o bien, antidiabéticos orales al no cubrir de forma aislada las necesidades prandiales.

- Bombas de insulina

Se ha extendido su uso en la última década en los pacientes con diabetes tipo 1. Sus puntos positivos fundamentales son que proporciona un ritmo insulínico basal uniforme, posibilidad de uso de ritmos insulínicos suplementarios, pudiendo liberalizar los horarios de las comidas y facilita un control glucémico estricto. No obstante, los problemas locales de colocación de la bomba, la dificultad del manejo por parte del paciente y la carestía del mecanismo dificultan su uso.

FORMAS DE INSULINIZACIÓN DEL PACIENTE HOSPITALIZADO

1. La insulina rápida en infusión continua: permite un excelente control, con una acción rápida y segura. Hay una serie de condiciones en la que es obligado su uso (Figura 5) y otras en las que podría ser aconsejable. Se deben utilizar siempre con suero glucosado en infusión continua. Para realizar el cálculo de las necesidades basales de insulina se puede considerar que es necesario 1 UI/hora o 0,02 UI/kg/hora. Si el paciente estaba previamente tratado y controlado con insulina subcutánea, se debe calcular la dosis total utilizada en las 24 horas previas al ingreso y pautar el 50% de ella en forma de infusión continua. Si el paciente estaba en dieta absoluta, con infusión de sueros, se puede calcular la dosis necesaria utilizando 1 unidad por cada 5 g de glucosa (aproximadamente 5 unidades con cada suero glucosado al 5%). Es conveniente monitorizar la glucemia cada 4 horas. En el caso en el que la glucemia no descienda hay que aumentar la infusión en un 50%. Si por el contrario la glucemia desciende por debajo de 100 mg/dL., hay que reducir la infusión un 50%.

INDICACIONES DE LA INFUSIÓN CONTINUA DE INSULINA

—Absolutas

Cetoacidosis diabética
Antes de procedimientos quirúrgicos mayores
Mal control con otras pautas en situaciones que
requieran control de glucemia estricto
Ayuno prolongado (más de 12 horas) en diabetes tipo
1 y probablemente en diabetes tipo 2
Infarto de miocardio
Enfermo en situación crítica y/o UCI
Después de cualquier trasplante
Shock (típicamente el cardiogénico)
Parto

—Rela **Figura 5.**

Hiperglucemia severa asociada a una enfermedad
aguda
Tratamiento inicial de la hiperglucemia por esteroides

2. Administración de insulina subcutánea (lenta más rápida), en paciente ya controlado en casa con insulina. Tras lo comentado previamente sobre la dieta, se puede mantener la pauta de insulina que el paciente traía de casa, disminuyendo ligeramente la dosis de insulina lenta, aproximadamente un 10 a 30%, y menos o nada la insulina rápida. En esta situación es aconsejable dejar prevista una pauta de insulina rápida "de rescate o pauta deslizante", para controlar las hiperglucemias en función de los resultados de la glucemia capilar realizados.
3. Administración de insulina prolongada o intermedia más rápida en pacientes que no utilizaban previamente insulina en casa. Esta es la pauta recomendada actualmente para los pacientes que ingresan y la única posible para los enfermos con diabetes tipo 1 que no sufran una descompensación insulínica o que no lleven una bomba de insulina. La insulina lenta, bien la insulina glargina o NPH proporciona la cantidad necesaria para cubrir las necesidades basales de insulina. La insulina rápida o Lispro o

Aspart proporciona la necesaria para cubrir las necesidades prandiales. Para calcular las dosis de insulina requeridas el rango aconsejado es amplio es función del peso. En el caso de diabetes tipo 1 iniciáramos la administración con 0,5-1 UI/kg/día en *diabetes tipo 1* y 0,3-0,4 UI/kg/día en *diabetes tipo 2* o el 80% de la cantidad de insulina en infusión que estuviese precisando o el 75% de la insulina rápida subcutánea que precisase. Una vez calculada la dosis requerida diaria de insulina hay que dividir la administración entre los dos tipos de insulina para cubrir los distintos requerimientos de insulina basal e insulina prandial. La insulina "basal" constituye el 60% de la cantidad total calculada, en forma prolongada (glargina) o en forma de insulina lenta (NPH), administradas una vez al día la glargina y 1 ó 2 veces la NPH. La insulina relacionada con la ingesta constituye el 40% de la misma. En forma de insulina rápida, preferiblemente Lispro o Aspart se administra antes de las tres comidas principales (desayuno, comida y cena).

En el caso de la insulina NPH suelen ser necesarios 2 dosis, 2/3 de la misma administrados antes del desayuno, y 1/3 antes de la cena. En los diabéticos tipo 2 también se puede intentar administrar una dosis única en el momento de acostarse. La insulina glargina, que tiene un menor riesgo de hipoglucemias que NPH, sólo requiere una sola dosis, a cualquier hora del día, manteniendo ese horario y variando la dosis en función de la glucemia basal. Si se administra insulina rápida se debe inyectar 30 minutos antes de las comidas, mientras que los análogos de insulina se pueden administrar inmediatamente antes de la ingesta.

Si el paciente estaba con insulina i.v. en perfusión: calcular la dosis diaria de las últimas 24 horas y administrar el 80% de dicha dosis.

4. Administración exclusiva de insulina rápida subcutánea. Esta pauta no es aconsejable como tratamiento exclusivo, pero su uso en el momento del ingreso es una práctica habitual en aquellos pacientes diabéticos que ingresan por cualquier otra patología y en los que es preciso ajustar el tratamiento de su diabetes. No hay evidencia de cómo iniciar la insulinización *de novo* en el paciente ingresado, pero sí muchas "fórmulas". De entrada, se puede calcular una dosis de 0,2 UI/kg/día, repartidas en tres inyecciones subcutáneas antes de desayuno, comida y cena. Si la cantidad es divisible por tres aplicar tres dosis iguales. Si no lo es inyectar algo más en la dosis de la comida más rica en calorías (en general el almuerzo). Esta pauta no se debe mantener durante más de 48 horas. La dosis orientativa se muestra en la figura 6. No controlan al paciente. Tratan la hiperglucemia después de que se produce pero no la previenen. Han demostrado una incidencia de 40% de hiperglucemias y de 23% de hipoglucemias (total 63% de episodios de mal control). El riesgo de hiperglucemia se multiplica por tres, en relación con pacientes no controlados. Sólo se debe utilizar exclusivamente para el tratamiento del diabético, en la urgencia o durante la guardia, durante las primeras horas del ingreso, sabiendo que no es la pauta adecuada para el control. La pauta de insulina rápida se debe iniciar siempre con una glucemia "elevada", habitualmente a partir de 150 mg/dl y por cada aumento de la glucemia de 50 mg/dl hay que subir 2 unidades de insulina en cada dosis.

RECOMENDACIONES DE INSULINA SEGÚN GLUCEMIA CAPILAR ANTES DE LAS COMIDAS				
Glucosa capilar	Muy sensibles a la insulina	Sensibilidad normal a la insulina	Resistentes a la insulina	Antes de dormir
< 100	0	0	0	
100-149	0-1	0-2	0-5	
150-199	1	2	5	
200-249	2	4	10	
250-299	3	6	15	0-2
300-350	4	8	20	2-4
> 350	5	10	25	4-6

Figura 6.

5. Transición de insulina rápida a insulina lenta: Para calcular la dosis de NPH que requiere una paciente hay que conocer la dosis de insulina rápida diaria que precisa el paciente para su control y calcular entre un 50 y 75% (o dos tercios o 66%) y aplicarla en dos dosis. Dos tercios de la dosis total antes del desayuno y un tercio antes de la cena. Si un paciente precisa 30 unidades de insulina rápida, necesitará unas 20 unidades de NPH o lo que es lo mismo 14 unidades antes del desayuno y 6 antes de la cena. Si por el contrario decidimos utilizar *insulina glargina* se calcula un 50% de la dosis de insulina rápida precisa para el control del paciente en una sola dosis, a cualquier hora del día, manteniendo ese horario y variando la dosis en función de la glucemia basal.
6. Control inicial con insulina lenta. En pacientes en los que se prevea que no van a necesitar la insulina a largo plazo, se puede intentar un control con una dosis única de insulina. Es probable que se precise insulina de acción corta como suplemento, para controlar las oscilaciones postprandiales, por lo que estaríamos en el punto 3. Los diabéticos tipo 2, con buena "reserva insulínica", podrían controlarse con esta pauta. Los diabéticos tipo 1 y los tipo 2 con mala reserva insulínica necesitan cubrir sus necesidades de insulina basal y además las prandiales, porque no son candidatos a esta pauta. La administración por la mañana se acompaña de menos episodios de hipoglucemia nocturna. También se puede intentar con insulina NPH en dosis única, calculando 0,3 UI/kg/día y administrarla en la cena o después de la misma, o dividirla en 2 dosis. En ambos casos hay que dejar prevista una insulina rápida de rescate para controlar la necesidad de insulina asociada a las comidas o "prandial".

TRATAMIENTO AL ALTA

Una vez estabilizado al paciente y alcanzados los objetivos planteados, nuestros esfuerzos deben estar centrados en ajustar el tratamiento de cara al alta. Sin pasar por alto la importancia de la educación diabetológica, pilar básico en el tratamiento de estos pacientes: el ejercicio físico y la dieta, lo que será necesario será el ajuste farmacológico.

Podríamos considerar que el paciente está estable cuando durante 2-3 días, las glucemias preprandiales son de 110 mg/dl y las postprandiales de 180 mg/dl. En este momento planteamos un tratamiento que sirva de puente entre el realizado en el hospital y el definitivo,

que deberá ser ajustado por su médico de atención primaria o por el médico que ha atendido al paciente en el hospital en su consulta externa.

Fundamentalmente nos encontraremos con pacientes que durante el ingreso habrán recibido: insulina rápida en infusión, insulina rápida subcutánea o insulina basal (glargina o NPH) más insulina rápida subcutánea. Las dos primeras fórmulas son insuficientes como tratamiento definitivo del diabético, sin embargo la última constituye una pauta de tratamiento definitiva. Valoraremos qué pacientes son candidatos a seguir con ella. Si durante el ingreso se ha iniciado algún tratamiento que pudiera ser definitivo y concluimos que está indicado, no habría que realizar ningún cambio antes del alta. Si por el contrario no fuera así se suspendería o se añadiría lo que considerásemos oportuno.

El diabético tipo 1, por definición, se va a ir de alta con insulina. Tanto las bombas de insulina, mediante la administración de insulina basal más bolos de insulina, como las pautas multidosis (MDI) con análogos de acción prolongada (glargina o NPH) y acción rápida, constituyen en la actualidad formas adecuadas de continuar el tratamiento insulínico en diabéticos tipo 1. Una vez asegurado que el paciente cumple criterios para tratamiento intensivo así como una buena tolerancia al mismo, debe ser remitido al especialista para continuar control.

Cuando ya se ha conseguido estabilizar al paciente con diabetes tipo 2, tras haberle tratado con insulina durante su ingreso, hay que plantear cuál es el mejor tratamiento con el que darle el alta. Los estudios epidemiológicos han demostrado que un buen control glucémico ($HbA_{1c} < 7\%$) reduce notablemente la incidencia de complicaciones vasculares, lo que representa para el paciente una mejor calidad y esperanza de vida (estudio UKPDS). Debe exigirse una corresponsabilidad del paciente basada en una educación adecuada que garantice una monitorización frecuente del tratamiento por parte del propio paciente. El abordaje terapéutico de estos enfermos no se tiene que centrar de forma exclusiva en el control de la glucemia. Es igualmente importante controlar la tensión arterial, con unas cifras tensionales menores de 130/80 mmHg, un control lipídico adecuado con cifras de LDL < 100 en prevención primaria y < 70 en prevención secundaria, uso de ácido acetil-salicílico a dosis bajas, si no existe contraindicación e insistencia en factores no farmacológicos como mantener el peso adecuado, hacer ejercicio continuado y abstenerse del consumo de alcohol y tabaco. La dieta es uno de los pilares básicos porque contribuye a reducir el peso, a un buen control de la tensión arterial, mantener un perfil lipídico óptimo y la normalización de la glucemia. El aporte calórico, la composición y distribución de los hidratos de carbono deberán ajustarse individualmente.

COSTES DE LA DIABETES EN ESPAÑA

Actualmente se calcula que la población con diabetes puede consumir entre un 4% a un 14% del gasto sanitario global en los países occidentales y un paciente con diabetes consume entre 2 y 6 veces más recursos directos que los individuos de similares edad y sexo con otras enfermedades crónicas. A pesar de la importancia sociosanitaria de esta enfermedad, en España en el momento actual existen escasas investigaciones publicadas acerca del coste económico asociado a la diabetes. Además, la mayoría de estos trabajos analizan aspectos más o menos parciales, tales como el coste de la medicación, del material de autoanálisis, de la

hospitalización o los costes directos ocasionados por la diabetes o sus complicaciones, pero no se abordan los costes directos indirectos como los días de baja perdidos o las incapacidades permanentes.

Diabetes tipo 1

Tras su comienzo, los pacientes con DM1 pasan por una etapa inicial que dura varios años, en la que los recursos se consumen básicamente en atención extrahospitalaria, fármacos y autoanálisis. Las complicaciones son principalmente agudas, poco importantes, aunque costosas si requieren ingresos hospitalarios. A partir de ahí, parece que los costes se duplican a expensas del tratamiento intrahospitalario de las complicaciones. Hart et al estimaron que el coste medio por paciente con DM1 durante el primer año del diagnóstico ascendía a 2.936 €, mientras que los restantes años de seguimiento, siempre que el paciente no desarrollase una complicación crónica, suponían un coste de 1.365 €. Calcularon que, de media, los pacientes con DM1 ocasionan un coste de 1.262 €/persona/año. Ballesta et al estimaron posteriormente, para una muestra de pacientes con DM1 del área Cádiz- San Fernando, un coste medio asociado a la diabetes de 3.311 €/paciente/año. Encontraron una relación estadísticamente significativa con variables número de ingresos relacionados con la diabetes, situación laboral de pensionista y presencia de complicaciones micro y macrovasculares.

Diabetes tipo 2

Los costes económicos ocasionados por los pacientes con DM2 se comportan de forma distinta, ya que muchos de ellos presentan complicaciones crónicas al diagnóstico de la enfermedad, pasando rápidamente a ser consumidores de recursos para el tratamiento de las mismas, sobre todo las de tipo vascular.

El estudio de Hart et al, publicado en 1997, se considera uno de los pioneros en el campo de la investigación de la economía en la diabetes, y es el primero que realizó la estimación del coste de esta enfermedad en nuestro país (sólo coste directo). El estudio de López Bastida et al estimó los costes socioeconómicos de la diabetes en la Comunidad Autónoma de Canarias durante el año 1998. En este trabajo los autores calcularon, por persona con diabetes y año, un coste total de 758,26 €/paciente/año, con una distribución del 62% para los costes directos y el 38% para costes indirectos. Esta cantidad supone el 2,13% del presupuesto dedicado a sanidad por el Gobierno canario. No obstante, los autores no consideran el coste de la medicación o los procedimientos para el tratamiento de las complicaciones asociadas a la diabetes, y tienen en cuenta las consultas de enfermería, consultas a especialidades médicas y quirúrgicas por causa de la diabetes, asistencia en urgencias ni hospitalizaciones por complicaciones de la diabetes. En el estudio multicéntrico europeo CODE-2 (Cost of type 2 diabetes in Europe), participaron 1.008 pacientes españoles cuyos datos se recogieron mediante la historia clínica y una entrevista personal. La edad media de los pacientes estudiados era de 67 años (56% mujeres y un 44% varones); la media de evolución de la enfermedad fue 10 años. El coste medio del paciente con DM2 fue de 1.305,7 €/paciente/año, de lo cual se infiere que para una población nacional conocida de 1,5 millones de enfermos

con DM2, el coste anual global ascendería a 2.000 millones de € (4,4% del gasto sanitario total español). En este trabajo, el 42% del coste correspondió a gastos de farmacia (554,28 €), el 32% a hospitalizaciones (417,28 €) y el 26% a gastos de atención ambulatoria (333,58 €). Los pacientes sin complicaciones presentaban un coste medio de 883 € por paciente y año, muy inferior al coste ocasionado por aquellos pacientes con complicaciones microvasculares (1.403 € por paciente y año), macrovasculares (2.021 € por paciente y año) o ambos tipos de complicaciones (2.132 € por paciente y año). No obstante, en el estudio CODE-2 no se considera el coste de los procedimientos terapéuticos para el tratamiento de las complicaciones, estancias en los servicios de urgencias hospitalarios o costes indirectos.

Finalmente Ballesta et al evaluaron una muestra de 517 pacientes con DM2 con una edad media de $63,4 \pm 12$ años y $9,7 \pm 8$ años de evolución media de la enfermedad. Los autores estimaron un coste anual asociado a la diabetes de 4.278 €/paciente/año; la partida de costes directos fue superior (2.504 €/paciente/año) que de costes indirectos (1.774 €/paciente/año). En el análisis univariante se observó que los costes totales fueron significativamente superiores en los pacientes varones (6.812 ± 11.588 €/paciente/año frente a 2.674 ± 4.683 €/paciente/año), obesos (5.394 ± 10.320 €/paciente/año frente a 3.792 ± 6.712 €/paciente/año), pacientes en tratamiento con insulina (8.508 ± 11.948 €/paciente/año frente a 3.139 ± 6.167 €/paciente/año). Los autores encontraron además una asociación significativa entre los costes totales asociados a la DM2 y las variables tiempo e evolución de la diabetes, valor promedio de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) y presencia de complicaciones. En este sentido, los pacientes con niveles promedio de HbA1c superiores a 7,5% (grupo de riesgo microvascular) presentaban unos costes directos, indirectos y totales más de 3 veces superior a los pacientes con niveles promedio de HbA1c < 6,5% (grupo de riesgo bajo). La presencia de complicaciones también incrementó notablemente los costes asociados a la diabetes, observándose un aumento de éstos en 3,5 y 10 veces en función de que el paciente presentase complicaciones microvasculares, macrovasculares o ambas, con respecto a los pacientes sin complicaciones.

2. LEGISLACIÓN EN LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

La experimentación animal es hoy una actividad básica de la ciencia médica. A ella se oponen los movimientos pro derechos animales, normalmente fundados en una visión meramente natural del hombre y los animales, que los iguala. También hay oposición desde el punto de vista científico: los resultados de la investigación animal rara vez serían directamente aplicables al hombre. Por contra, los resultados encontrados en los animales son parcialmente aplicables al hombre, y la diferencia cualitativa entre el hombre y el animal es el fundamento que permite la experimentación animal.

El empleo de animales en investigación, históricamente reciente en Medicina, se ha visto acompañado de controversias y campañas denigratorias. Estos sucesos han hecho reflexionar a los investigadores sobre la licitud de estas intervenciones con los animales; de dicha reflexión se deriva el moderno desarrollo de las normativas y comités de ética para la experimentación animal (CEEa), así como de la legislación específica.

No obstante, aunque el presente trabajo hable en concreto de la experimentación con perros en el campo de la diabetes, no hay una legislación específica al respecto, sino que esta actividad se rige por las leyes generales en materia de experimentación animal a nivel europeo, español y catalán.

INTERNACIONAL

Derechos de los animales

Hasta que el 15 de octubre de 1978 se proclamó la **Declaración Universal de los Derechos de los Animales**, que fue aprobada por la Organización de la Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), y posteriormente por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), no había, a nivel internacional, ningún texto que a efecto oficial recogiese los derechos de los animales. Esta declaración de derechos pretendía así crear una ética social para proteger a los animales del maltrato y acciones crueles.

El texto consta de 14 artículos que recogen los principios de dignidad, longevidad, respeto, buen trato, libertad y cuidados a los que todos los animales sin excepción tienen derecho. No obstante, esta declaración no constituye una legislación ni trata de manera específica la multitud de situaciones en que se pueden ver vulnerados los derechos de los animales.

International guiding principles for biomedical research involving animals

El 1985 la CIOMS (Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas) publicó los **Principios generales internacionales para la investigación biomédica que involucran animales** como resultado de extensas consultas internacionales e interdisciplinarias que abarcan el período de tres años 1982-1984.

Los principios que recoge el presente texto pretenden establecer un protocolo ético y justo para los animales que van a ser utilizados para la experimentación médica. Toma en cuenta todo el trayecto que siguen los animales utilizados para éste fin: desde su cría para éste propósito hasta la obligación de proporcionarles una muerte digna, rápida e indolora, siendo así fiel a la Declaración Universal de los Derechos de los Animales.

Cabe recalcar que no es un texto de aplicación legal, es decir, no es aplicativo a modo de Ley.

ANEXO X

Legislación EUROPEA

En Europa, existe un **Convenio Europeo para la protección de vertebrados empleados para experimentación y otros propósitos científicos, de 18 de marzo de 1986**, enmendado por un **protocolo el 22 de junio de 1998**. España ha ratificado este Convenio, y tiene vigor de ley en todo el estado desde 1991; sin embargo su enmienda aún no.

El presente Convenio (en su versión ya enmendada) se aplica a cualquier animal (ser vivo vertebrado no humano, excluyendo las formas fetales o embrionarias) utilizado o destinado a ser utilizado en cualquier experimento u otro procedimiento científico en el que dicho procedimiento puede causar dolor, sufrimiento, estrés o daño duradero. No se aplica a las demás prácticas veterinarias clínicas o agrícolas. Además, el Convenio cita explícitamente que siempre se podrán aplicar normas más estrictas si el país en cuestión así lo cree conveniente.

El convenio enumera los procedimientos susceptibles a la utilización de animales para experimentación (incluye la investigación de tratamientos para enfermedades de vertebrados y humanos como es el caso que nos ocupa en este trabajo), sin embargo prohíbe su uso si para ello existe otro método científico satisfactorio y factible que no requiera el uso de animales.

Los animales utilizados deberán ser provistos de un alojamiento adecuado (con mínima libertad de movimientos), comida, agua y atención veterinaria, y todos estos parámetros deberán ser revisados a diario (la guía específica para el alojamiento y cuidado de estos animales se encuentra en el Apéndice A del presente Convenio).

Todos los procedimientos a realizar deben llevarse a cabo provocando el mínimo sufrimiento al animal (anestesia o analgesia) y aquellos que puedan causar un dolor severo con posibilidad de perdurar en el tiempo precisaran de justificación y autorización específica por parte de las autoridades responsables.

Se deberán diseñar procedimientos y utilizar equipos que permitan la utilización del menor número de animales posible, y éstos deberán estar marcados e identificados de la forma más permanente y menos dolorosa posible.

Al final del procedimiento se deberá decidir si el animal puede continuar con vida o debe ser sacrificado de manera humanitaria (eutanasia) por la posibilidad que sufra dolor o estrés

duraderos. Dicha decisión deberá ser tomada por un veterinario o, en su defecto, por la persona responsable de la realización del experimento.

Con el fin de evitar la repetición innecesaria de los procedimientos exigidos por la ley en materia de salud y seguridad, se deberán reconocer, cuando sea factible, los resultados de experimentos llevados a cabo en otros territorios.

En el convenio se establece que dentro de los cinco años siguientes a la entrada en vigor de la presente Convención, y posteriormente cada cinco años, o con más frecuencia si una mayoría de los países así lo pidiere, celebrarán consultas multilaterales en el seno del Consejo de Europa para examinar la aplicación del presente Convenio, y la conveniencia de revisar o ampliar algunas de sus disposiciones. Estas consultas tendrán lugar en reuniones convocadas por el Secretario General del Consejo de Europa, cuya normativa para su procedimiento se establecerá por parte de cada país (lógicamente sin perjuicio de las disposiciones del presente Convenio).

A modo de resumen, se puede decir que el presente Convenio vela por:

- Limitar la utilización de animales con fines experimentales y otros fines científicos.
- Sustituir su utilización siempre que sea posible.
- Tratar de encontrar métodos alternativos, fomentando la aplicación de éstos.
- Procurar unas condiciones de bienestar a los animales utilizados.
- Considerar el carácter técnico de las disposiciones que figuran en los anexos al Convenio.
- Reconocer la necesidad de garantizar la adecuación de estos últimos resultados de la investigación en los campos a que los mismos se refieren.

Algunas cuestiones concretas contempladas de forma no suficientemente profunda en el presente Convenio tuvieron que ser tratadas posteriormente en los textos siguientes:

- Resolución sobre la interpretación de ciertas disposiciones y expresiones del Convenio para la protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos (1992).
- Resolución sobre la formación y educación de las personas que trabajan con animales de laboratorio (1993).
- Resolución sobre instalaciones y cuidados a los animales de laboratorio (1997).
- Resolución sobre adquisición y transporte de los animales de laboratorio (1997).
- Declaración de intenciones sobre animales usados con propósitos científicos (1997).

Los motivos de la enmienda del convenio inicial fueron el trámite para la modificación respecto a las características de alojamiento y manejo, detalladas en los apéndices, pues la modificación de éstas era lenta y ardua.

Según este proyecto, el nuevo anexo estaría dividido en dos partes, A y B. La parte

A cuenta con una Sección General, que da líneas directrices para el alojamiento y los cuidados de los animales de experimentación o destinados a otros fines científicos. Esta sección se desarrolla con condiciones adicionales para las especies que se utilizan con mayor frecuencia (roedores y conejos, perros, gatos, hurones, animales de granja, aves, primates no humanos, peces, anfibios y reptiles). En la segunda parte (conocida como parte B), los expertos que han intervenido en la elaboración del anexo, aportan una justificación científica acerca de las directrices que se fijan en la parte A.

En Europa, la primera legislación global es la **Directiva 86/609/CEE del Consejo de Europa, de 24 de noviembre de 1986**, que se complementa con la **Resolución 86/C331/02**, de la misma fecha.

El objetivo de la presente Directiva es el de ser el instrumento de aplicación del Convenio anteriormente citado. Pretende garantizar, en el caso de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, la armonización de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros relativas a la protección de dichos animales, a fin de evitar que no se perjudique el establecimiento y el funcionamiento del mercado común, en particular mediante distorsiones de la competencia o barreras comerciales.

La presente Directiva básicamente contempla los aspectos presentes en el Convenio Europeo anteriormente citado y es de obligada aplicación en todos los Estados miembros.

Dicha Directiva dispone la obligación que con intervalos regulares que no superen los tres años, y por primera vez cinco años después de la notificación de la presente Directiva, los Estados miembros informarán a la Comisión de las medidas que se hayan tomado en este campo y presentarán el correspondiente resumen de la información recogida conforme al artículo 13 (información estadística sobre la utilización de animales en experimentos, así como las medidas tomadas para mantener la confidencialidad de las informaciones que presenten un interés comercial particular); la Comisión preparará un informe para el Consejo y para el Parlamento Europeo.

El 22 de julio de 2003 se modifica dicha directiva (Directiva 86/609/CEE del Consejo de Europa) por la **Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo**

Dicha nueva Directiva tiene la intención de garantizar la coherencia de los anexos de la Directiva 86/609/CEE con la evolución científica y técnica más reciente, así como con los resultados de la investigación en los ámbitos de que tratan. Expone que según la anterior Directiva, cualquier cambio de los anexos sólo se puede aprobar por el lento procedimiento de codecisión, lo que provoca que su contenido quede anticuado respecto de los últimos avances en este ámbito. Así pues incluye cambios en las medidas necesarias para la ejecución de la presente Directiva en lo que respecta a los anexos, además de asignar un Comité (que deberá aprobar su reglamento interno) que asista la Comisión.

Los Estados miembros tuvieron que poner en vigor las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo dispuesto en la presente Directiva antes del 16 de septiembre de 2004, e informar de ello inmediatamente a la Comisión.

El 20 de octubre de 2010 se publicó en el Diario Oficial de la Unión Europea una nueva directiva del 22 de septiembre del mismo año. Esta nueva Directiva **(2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos)** fue un acontecimiento decisivo para el campo de la experimentación en animales en Europa, pues su fin era ofrecer una mayor protección de los animales de laboratorio y una mejora de sus condiciones de vida. Una directiva basada firmemente en “el principio de las tres Rs”: reemplazar, reducir y refinar el uso de animales por motivos científicos. Se afirmó que esta directiva establecía los estándares de bienestar animal más altos del mundo, pero muchas organizaciones animalistas se mostraron escépticas.

Esta nueva directiva se regía por los principios básicos establecidos ya en las pasadas directivas aumentando la especificidad y las exigencias para el trato de estos animales.

Legislación ESPAÑOLA

En España, el legislador se limitó inicialmente a trasladar las exigencias europeas a la ley Nacional en el **Real Decreto 223/1988** del 14 de marzo sin añadir unas exigencias más estrictas. Esta ley fue derogada el 22 de noviembre de 2005 por el nuevo **Real Decreto 1201/2005** del 21 de octubre que comentaremos más adelante.

En el presente Real Decreto (ya derogado) se expresa la necesidad de la promulgación de una norma que incorpore al ordenamiento legal español lo dispuesto en la Directiva 86/609/CEE del Consejo de Europa, de 24 de noviembre de 1986. Además, delega a las Comunidades Autónomas, en el ámbito de sus respectivos territorios, la competencia para el cumplimiento de lo dispuesto en el presente Real Decreto, así pues deberán proceder al registro de los establecimientos de cría, suministradores y usuarios, así como a la autorización, en su caso, de la utilización de animales en los experimentos; además deberán comunicar trimestralmente al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación los datos registrales de los establecimientos. Quedan exentos de dicha competencia los establecimientos de titularidad estatal, los cuales serán competencia del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

El motivo de la derogación de esta ley el 22/11/2005 recae en que la normativa europea y esta ley nacional no obligan a que los protocolos de investigación con animales sean supervisados por un Comité de Ética de Experimentación Animal, se daba una curiosa paradoja: las convocatorias de proyectos de investigación que realizaba el Gobierno solicitaban, entre la documentación del proyecto que financiarían, la aprobación del protocolo que emplee animales por un Comité de Ética de Experimentación Animal, pero la ley no preveía cómo deben estar constituidos, sus funciones, etc. Ante este vacío, cada institución ha ido constituyendo su propio comité, generalmente con una mirada puesta en los que funcionan hace tiempo en Estados Unidos o en otros países de Europa. Aparte de estos comités cada vez más difundidos, ante este vacío, el Colegio de Biólogos ha establecido unos Comités de Evaluación, distintos de los Comités de Ética colegiales, que se encargan, a petición de los

investigadores, de evaluar si un procedimiento de investigación se adecua o no a lo establecido por la ley española.

No deja de llamar la atención que dichos Comités de Evaluación se regulan con una normativa del Colegio de Biólogos que se refiere simultáneamente a la experimentación sobre seres humanos y sobre animales.

Legislación CATALANA

Dentro de España, las distintas Autonomías tienen la potestad de legislar de modo más estricto que la ley nacional. Sin embargo, prácticamente todas se limitaron a recoger, en Órdenes autonómicas, el contenido de la ley española de 1988.

La excepción la constituye Cataluña, con su **Ley 5/1995**, que posteriormente fue desarrollada por el **Decreto 214/1997** (más concreta que la anterior en muchos aspectos, como por ejemplo a la formación del personal), corregido por los **Decretos 286/1997** en materia de modificación de los plazos de presentación de documentos y notificaciones de acuerdo con el presente Decreto, y **164/1998** en materia de adición de exigencia de un ciclo formativo de laboratorio de la familia profesional sanitaria además de la química para el personal y validación de los cursos de formación del personal realizados fuera de Cataluña mientras se adecuen a las materias establecidas en los anexos.

En la Ley 5/1995, además de las medidas vigentes por la normativa europea y española, se establecían dos notables diferencias:

En primer lugar, se crea la Comisión de Experimentación Animal, que se encarga de supervisar, desde el gobierno autonómico, todas las cuestiones relativas a la experimentación animal, y obliga a los centros a la creación de los Comités Éticos de Experimentación Animal, cuya composición está determinada por la Comisión de Experimentación Animal (no por la ley misma).

La creación de estos Comités éticos es de obligado cumplimiento en todos los centros que utilicen animales de experimentación. El Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca ha de establecer por reglamento la composición y las funciones de estos comités, de forma que se garanticen la experiencia y los conocimientos técnicos del personal que los integre, así como que alguno de sus miembros no tenga relación directa con el centro o con el procedimiento de experimentación de que se trate. El reglamento referido a la organización, capacidad y estructura de los centros puede establecer criterios para eximirlos de la obligación de crear un Comité Ético; en tal caso, el reglamento ha de establecer los mecanismos de control adecuados, a los cuales han de someterse los dichos centros.

En segundo lugar, la ley catalana, en su capítulo VI, tipifica los delitos contrala ley, dividiéndolos por su gravedad en leves, graves y muy graves (van desde pequeños fallos de tipo administrativo a la realización reiterada de experimentos no aprobados o contra la ley), y estableciendo las sanciones correspondientes a cada grado de delito: las infracciones leves se sancionan con una multa de de 10.000 a 100.000 pesetas (equivalente a 60-600€), las graves con una multa de 100.001 a 2.000.000 de pesetas (equivalente a 601-12.020€) y las

infracciones muy graves con una multa de 2.000.001 a 15.000.000 de pesetas (equivalente a 12.021-90.152€).

Para la clasificación de las sanciones se deben tener en cuenta 3 factores: su trascendencia social y el perjuicio causado al animal, la cuantía de beneficio ilícito obtenido con la infracción, y la culpa o reincidencia en la comisión de la infracción.

El **Decreto 214/1997** en el que se desarrolló la Ley 5/1995 contiene una serie de normas que crean obligaciones nuevas a las cuales deben ajustarse las personas que realizan las actividades que se regulan, y para facilitar la adaptación a la nueva normativa se considera conveniente modificar los aspectos que inciden en su aplicación inmediata. Para adecuar ciertos aspectos del decreto a la enseñanza que se cursa en la actualidad se realizaron las modificaciones anteriormente citadas presentes en el Decreto 286/1997 y en el Decreto 164/1998.

En la posterior **Ley 22/2003** del 4 de julio de protección de los animales, aunque no sea una ley específica para los casos de experimentación con animales, se expone explícitamente que queda totalmente prohibida la instalación, en todo el territorio catalán, de granjas, centros de cría o centros de suministro de primates que tengan como objeto su reproducción o comercialización para experimentación animal. Por lo demás expone que los animales utilizados para la experimentación y otras finalidades científicas deben regirse por la normativa específica para esta materia.

Lógicamente Cataluña también se rige por la legislación española en esta materia (Real Decreto 1201/2005 del 21 de octubre).

Nueva legislación ESPAÑOLA:

Ya se ha citado que la primera legislación española en esta materia (Real Decreto 223/1988) fue derogada por el **Real Decreto 1201/2005** del 21 de octubre.

Dicho Real decreto básicamente recoge las dos novedades que aportaba la ley catalana de 1995, en la que se inspira en buena medida, pues adopta la creación obligada de comités en los centros de investigación y de comisión nacional, y la realización de controles administrativos.

De este modo se resuelve así la incongruencia mencionada de la ley anteriormente vigente con respecto a la existencia de los Comités de Ética de Experimentación Animal, pues obliga a su creación. Sin embargo se contempla la posibilidad de exención de la creación de comités los casos excepcionales establecidos por la Dirección General de Ganadería, y en dichos casos las funciones de los comités convencionales, deberán ser asumidas por un comité reconocido por la autoridad competente. Dichas funciones de los Comités incluyen informar de la idoneidad de cada procedimiento en relación con los objetivos del estudio, la posibilidad de alcanzar conclusiones válidas con el menor número posible de animales, la consideración de métodos alternativos a la utilización de los animales y la idoneidad de las especies seleccionadas; informar de que cada procedimiento se lleva a cabo ajustándose a la memoria descriptiva notificada o aprobada; informar sobre la realización de los procedimientos, en especial de los

que evitan el sufrimiento del animal (anestesia, analgesia e incluso eutanasia); y asegurar que el personal participante posee la formación adecuada para ello.

Sin embargo, la nueva ley española aporta algunos cambios con respecto a la catalana. Por mencionar algún punto más destacado, llama la atención el cambio de nombre de los comités, que la ley denomina Comités éticos de bienestar animal, para los centros, y Comisión ética estatal de bienestar animal, para la nacional. La composición y las funciones de ambos están fijadas por la ley.

Los Comités éticos de los centros ven aumentadas sus competencias: de ser sólo una instancia consultiva para obtener el visto bueno para la experimentación, pasan a tener una función supervisora, pues han de informar sobre la práctica de los métodos de alivio y eutanasia de los animales, y sobre la formación de quienes interaccionan con los animales (anexo I). Paradójicamente, aunque se establece la realización de inspecciones a los centros, no se prevén en la ley ninguna tipificación de faltas ni sanciones.

Posteriormente, la **LEY 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio** constituyó la primera herramienta a nivel Estatal para tipificar las infracciones realizadas en materia de experimentación con animales y aplicar sus consecuentes sanciones.

Esta ley, como en el caso de la establecida en Cataluña, clasifica en 3 tipos las infracciones: Muy graves (multas de 6.001 a 100.000€), graves (multas de 601-6.000€) y leves (multas como máximo de 600€ o apercibimiento en su defecto). Además de las sanciones económicas también se contemplan sanciones accesorias (como el decomiso de los animales, el cese o interrupción de la actividad, o la clausura de establecimientos en el caso de sanciones muy graves), medidas provisionales (como la incautación de los animales, paralización de las actividades o la no expedición de los documentos legalmente requeridos), medidas no sancionadoras (como por ejemplo la clausura de establecimientos o la suspensión de su funcionamiento hasta tanto se subsanen los defectos o se cumplan los requisitos exigidos) y multas coercitivas (en los casos en que el interesado no ejecute las medida provisionales o no cumpla con la sanciones impuestas).

El personal con función inspectora concerniente a la materia a la que esta Ley se refiere, estará formado por personal al servicio de las Administraciones Públicas, el cual deberá tener cualificación y formación suficiente para el ejercicio de estas tareas.

La potestad de estas sanciones corresponde a los órganos competentes de las Comunidades Autónomas y a la Administración General del Estado. Cuando dichas sanciones sean competencia de la Administración General del Estado, la iniciación del procedimiento corresponderá al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y la instrucción al órgano de dicho Ministerio que tenga atribuidas las funciones en materia de protección animal.

La resolución correspondiente será dictada por el Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación (infracciones leves y graves) o por el Consejo de Ministros (infracciones muy graves).

Legislación en las COMUNIDADES AUTÓNOMAS:

Según el volumen IV de la legislación relativa a protección animal (bienestar animal) expuesto por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación la legislación existente en las comunidades autónomas españolas son las siguientes:

Andalucía

Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de Protección de los Animales. (BOJA nº 237, de 10 de diciembre de 2003).

Decreto 142/2002, de 7 de mayo, por el que se crea y regula el Registro de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación y otros fines científicos. (BOJA nº 55 de 11 de mayo de 2002).

Decreto 199/2005, de 20 de septiembre, por el que se modifica el Decreto 142/2002, de 7 de mayo (BOJA 189).

Aragón

Ley 11/2003, de 19 de marzo, de protección animal, de la Comunidad Autónoma de Aragón. (B.O.A. nº 35, de 26 de marzo).

Orden de 25 de agosto de 1988, del Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes, por la que se dictan normas sobre protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. (BOA de 14 de septiembre de 1988).

Cantabria

Orden de 2 de febrero de 1989, de la Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (B.O.C de 20 de febrero de 1989).

Cataluña

Ley 5/1995, de 21 de junio, sobre Protección de los Animales utilizados para experimentación y otras finalidades científicas. (DOGC nº 2073 de 10 de julio de 1995).

Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas. (DOGC nº 2450 de 7 de agosto de 1997).

Decreto 286/1997, de 31 de octubre, de modificación del Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas. (DOGC nº 2518 de 14 de noviembre de 1997).

Decreto 164/98, de 8 de julio, que modifica el Decreto de 30 de julio de 1997. (DGC de 14 de julio de 1998).

Ley 22/2003, de 4 de julio, de protección de los animales (DOGC 3929, de 16.7.2003, BOE de 8 de agosto).

Comunidad de Madrid

Orden de 4 de agosto de 1989 del Consejero de Agricultura y cooperación por la que se dan normas sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (BOCM de 24 de agosto de 1989).

Comunidad de Navarra

Orden Foral de 5 de agosto de 1991, del Consejero de Agricultura, Ganadería y Montes, sobre protección de los animales utilizados en experimentación y fines científicos en la C.F de Navarra (BON del 23 de agosto de 1991).

País Vasco

Orden de 25 de junio de 1991, del Consejero de Agricultura y Pesca, por la que se dictan normas sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. (B.O.P.V. 136, del 4 de julio).

3. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Aún persisten múltiples incógnitas acerca de los acontecimientos que dan lugar a la disfunción de la célula β , tanto a nivel fisiológico como molecular. La comprensión de los mismos es imprescindible para el avance en la prevención y tratamiento de esta enfermedad, que ya afecta a cerca de 150 millones de personas en todo el mundo.

Todavía hay muchos impedimentos para el estudio de la diabetes en seres humanos. Éstos incluyen heterogeneidad genética, una esperanza de vida larga, una amplia diversidad de estilos de vida, relativa inaccesibilidad a tejidos y órganos y, por supuesto, consideraciones de tipo ético. El uso de modelos animales soslaya algunos de estos problemas, pero, obviamente, la extrapolación de resultados de animales al hombre (y viceversa) conlleva cierto riesgo. No obstante, las ventajas inherentes a la experimentación animal han permitido obtener gran cantidad de información valiosa acerca de la patogénesis de la enfermedad. En 1922, Banting, Best, Collip y colaboradores publicaron su histórico artículo describiendo la curación de la diabetes mellitus en un perro. A partir de entonces se utilizaron ampliamente tanto perros como animales de otras especies para analizar diversos parámetros biológicos y fisiológicos de la diabetes.

CUESTIONES ÉTICAS Y MORALES DE LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Los modelos animales se han utilizado ampliamente en la investigación de la diabetes. Los primeros estudios utilizaron perros pancreatectomizados para confirmar el papel central del páncreas en la homeostasis de la glucosa, culminando con el descubrimiento y la purificación de la insulina. Hoy en día, la experimentación animal es polémica y está sujeta a restricciones legales y éticas que varían en todo el mundo. La mayoría de los experimentos se llevan a cabo en roedores, aunque algunos todavía se realizan en animales más grandes.

Es importante reconocer que algunas personas consideran la experimentación animal como un medio injustificado de buscar conocimiento sobre la diabetes mellitus humana. Hay quienes tienen la firme convicción de que es moralmente indefendible para la humanidad someter a animales a procedimientos experimentales que les causen algún grado de incomodidad, ya que un animal es incapaz de dar su consentimiento informado y no se beneficia directa o indirectamente de los estudios. En el otro extremo, unos pocos médicos científicos argumentan que deberían tener libertad para realizar los experimentos que consideren adecuados con un poco o nada de interferencia externa. Es importante tener en cuenta que las restricciones legales y la rigurosidad con las que son se aplican las leyes que rodean a la experimentación animal varían considerablemente en todo el mundo e incluso dentro de Europa.

Más adelante, hablaremos más profundamente sobre toda la ética que rodea la experimentación animal, pero antes, queremos hacer un breve repaso sobre los diferentes modelos animales que hay para el estudio de la diabetes.

MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA DIABETES

MELLITUS

Diabetes tipo 1

Tras el descubrimiento de la insulina, la disponibilidad de modelos animales para el estudio de la patogénesis de la diabetes tipo 1 se demoró sin embargo otros 50 años. Uno de los primeros modelos fue la insulinitis experimental inducida mediante administración de preparaciones de insulina en diversas especies animales. Este tipo de modelos reproducían los hallazgos morfológicos de la insulinitis, pero raramente indujeron hiperglicemia. Más adelante, en ratones, llegaron descripciones de la diabetes con un posible componente inmune tras infección con el virus de la encefalomiocarditis, así como tras la administración de dosis bajas múltiples de estreptozotocina, que inducía tanto insulinitis como hiperglicemia.

Aunque la diabetes espontánea no es una enfermedad exclusiva del hombre, las descripciones de la enfermedad en animales son muy escasas. En 1974, se observó que una rata en los laboratorios de BioBreeding en Canadá desarrolló espontáneamente diabetes con insulinitis y cetoacidosis. Algunos años más tarde, un ratón que también desarrolló diabetes e insulinitis espontáneas fue descubierto en el Japón. Ambos modelos, la rata de BioBreeding (BB) y el ratón diabético no-obeso (NOD), se han convertido en los modelos experimentales más importantes de diabetes tipo 1.

Diabetes tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa un heterogéneo grupo de enfermedades caracterizado por un aumento en la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos y un deterioro en la secreción de dicha hormona por parte de la célula β pancreática. Ambas anomalías se encuentran íntimamente imbricadas, pero, en la mayoría de los enfermos, la resistencia a la insulina precede a la disfunción manifiesta de las células β , y se piensa que tiene su origen en una predisposición genética. Además, puede observarse disfunción subclínica de las células β en familiares de primer grado no diabéticos de pacientes con DM2, lo cual es consistente con la hipótesis de que el fracaso de la célula β se encuentra también determinado genéticamente.

La identificación de los genes responsables permitiría avanzar en el conocimiento de los mecanismos que mantienen los niveles normales de glucosa y cuya disfunción provoca la enfermedad. Además, podría ayudar a obtener fármacos antidiabéticos más eficaces, diseñados para contrarrestar la anomalía específica, así como a identificar los individuos de riesgo que más podrían beneficiarse de tratamientos y/o cambios en el estilo de vida antes de que la enfermedad se desarrolle.

La predisposición a la resistencia insulínica y/o a la disfunción de células β se hereda de forma no Mendeliana, debido a su heterogeneidad genética y patogenia multigénica. Además, factores medioambientales tales como dieta inadecuada e inactividad física pueden modular las manifestaciones del genotipo (penetrancia incompleta) o bien imitar la contribución génica, dando lugar a fenocopias. Así pues los estudios genéticos humanos acerca de la predisposición

a la resistencia insulínica están plagados de incertidumbres y se ven complicados además por las considerables variaciones existentes en el pool genético humano.

Este es el motivo de que se hayan diseñado multitud de modelos animales (en su gran mayoría, ratones) transgénicos y knock-out, portadores de mutaciones en genes requeridos para la secreción y/o acción de la insulina, como método de análisis de un sistema genético de semejante complejidad.

En una primera clasificación, podemos dividir los modelos de DM2 según su mecanismo de producción en modelos espontáneos e inducidos. Además, en los modelos espontáneos se pueden distinguir dos categorías: modelos análogos y modelos intrínsecos⁴.

Modelos espontáneos:

Se trata de estirpes que se mantienen relativamente inalteradas mediante cruces endogámicos y que proceden bien de un animal en el que se ha detectado diabetes espontánea, bien de una serie de cruces selectivos favoreciendo un determinado rasgo fenotípico de la DM2 humana.

Modelos análogos

- La rata Goto-Kakizaki (GK):

El mejor modelo espontáneo de DM2 es la rata GK, que fue desarrollado en la década de los 90 por dos investigadores japoneses mediante cruces endogámicos recurrentes de ratas no diabéticas (Wistar), pero con niveles plasmáticos de glucosa en el límite alto de la normalidad. Al nacer, la rata GK presenta un número reducido de islotes de Langerhans. Dicho modelo sugiere así mismo la existencia de factores epigenéticos, de tal manera que la hiperglicemia *in utero*, cuando la hembra GK expone a su feto a niveles altos de glucosa, puede ser responsable del desarrollo anormal de las primeras células β en el esbozo pancreático, de ahí la idea de que la DM2 humana pueda tener su origen en el desarrollo fetal temprano y permanecer posteriormente latente durante décadas.

La rata GK desarrolla algunas características que pueden ser comparadas con las complicaciones de la diabetes humana, incluyendo lesiones renales, cambios estructurales en los nervios periféricos y anomalías en la retina.

- El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO):

Se trata de una cepa endogámica de ratones originaria de Nueva Zelanda y seleccionada por obesidad poligénica. Los ratones NZO de ambos sexos presentan elevado peso desde su nacimiento y aumento de su grasa corporal, que refleja predominantemente hipertrofia

de los adipocitos más que hiperplasia de los mismos.

El desarrollo de diabetes en este modelo representa un complejo fenómeno tipo umbral en el que la tasa de adiposidad precoz establece un nivel diabetogénico de resistencia a la insulina. Los ratones NZO machos desarrollan hipertensión cuando se les somete a una dieta con

elevado contenido graso. A las 8 semanas de vida, a pesar de la obesidad, los ratones permanecen normoglicémicos y con niveles plasmáticos de insulina y leptina no demasiado elevados. La hiperglicemia es de aparición tardía (alrededor de la semana 16) y evolución crónica una vez establecida. Como anomalías metabólicas precoces se han documentado tanto resistencia a la insulina como excesiva producción de glucosa por parte del hígado.

- El ratón KK:

La cepa original se obtuvo en Japón, mediante cruces seleccionando los individuos con mayor peso y, de modo característico, estos ratones adquieren obesidad gradual cuando se hacen adultos, además de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensadora e hiperplasia de células insulares, apareciendo finalmente una discreta hiperglicemia.

La ingesta alimenticia es un factor de importancia para la gravedad del fenotipo diabético y la restricción de la ingesta calórica reduce tanto la obesidad como la hiperglicemia en estos ratones.

- *Psammomys obesus* (rata israelí de la arena):

En su hábitat natural, el *Psammomys obesus* sigue una dieta esencialmente vegetariana, sin embargo, cuando se alimenta con dieta estándar de rata de laboratorio, se hace obeso, resistente a la insulina e hiperglicémico. Si además se usa una dieta rica en colesterol, los animales desarrollan hiperlipidemia y aterosclerosis. Al igual que en la DM2 humana, el estado hiperglicémico se asocia con un aumento de los niveles de proinsulina y productos de fragmentación, presumiblemente debido a la elevada demanda de secreción insulínica por la resistencia periférica a dicha hormona. También se ha encontrado alteración en la biosíntesis de insulina en los islotes de Langerhans.

- La rata OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat*):

Sus características incluyen: a) un desarrollo tardío de la hiperglicemia (tras 18 semanas de edad); b) un curso crónico de la enfermedad; c) discreta obesidad; d) aparición clínica de diabetes principalmente en los machos; e) participación de múltiples genes diabetogénicos recesivos, la transmisión de uno de los cuales (denominado odb-1) se encuentra ligada al cromosoma X, y f) nefropatía diabética, en forma de glomeruloesclerosis difusa y lesiones nodulares. Además, existen alteraciones en los islotes pancreáticos que pueden ser clasificadas en tres estadios: a) precoz (menos de 9 semanas de edad), con discreta infiltración linfocitaria; b) hiperplásico (10-40 semanas de edad), con incremento del número de células y fibrosis dentro o alrededor de los islotes, y c) final (más de 40 semanas de edad), con atrofia de los islotes. Las citadas manifestaciones clínicopatológicas de las ratas OLETF se asemejan bastante a las de la DM2 humana.

Es de destacar que las ratas OLETF son portadoras de un alelo nulo para el gen de la colecistoquinina A (CCK-A), lo cual conlleva una capacidad reducida para procesar las señales gastrointestinales de saciedad tras la ingesta de nutrientes. Esto puede ser la causa de un aumento de la cantidad de alimento en cada ingesta, con hiperfagia y obesidad. Además, los análisis de patrones de expresión génica hipotalámica indican la presencia de un déficit primario en la señalización del neuropéptido Y en el hipotálamo dorsomedial. Así pues, la

obesidad en la rata OLETF puede ser debida al mal funcionamiento de dos vías de regulación, una periférica, como es la saciedad tras la ingesta, y otra relacionada con mecanismos centrales críticos para el mantenimiento del balance energético global.

La DM2 de las ratas OLETF puede ser prevenida eficazmente mediante el ejercicio cuyo efecto protector perdura al menos 3 meses tras el cese del mismo. También la administración de insulina logra evitar tanto la disfunción de las células β como los cambios morfológicos en el páncreas.

Modelos intrínsecos

- El ratón *db/db*:

El “gen de la diabetes” (*db*) se transmite de modo autosómico recesivo y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria. La mutación *db/db* muestra muchas de las características de la DM2 humana. La evolución de estos ratones es bifásica, mostrando primero hiperinsulinemia y después hipoinsulinemia. La fase hiperinsulinémica aparece alrededor de los 10 días, acusando ya discreta elevación de la glucemia alrededor del mes y siendo franca la hiperglicemia a las 8 semanas de edad. A los 5 ó 6 meses, el peso corporal comienza a descender en paralelo con una degeneración de las células β de los islotes, entrando en la fase hipoinsulinémica.

- El ratón *ob/ob*:

A diferencia de los mutantes *db/db*, los ratones *ob/ob* son portadores de una mutación en el gen de la propia leptina. Representa un buen modelo para el estudio de la obesidad, siendo la incidencia de diabetes en estos ratones relativamente baja. Esta cepa tiene además una esperanza de vida más larga y sintomatología menos acentuada que la del mutante *db/db*.

- El ratón *Agouti*:

Los ratones homocigotos para diferentes mutaciones, ya sean *Ay* (letal) o *Avy* (viable), en el gen *agouti* muestran un fenotipo complejo con obesidad y resistencia a la insulina, además de su típico color amarillo.

En humanos, *agouti* se expresa en varios tejidos, incluyendo el adiposo, sugiriendo que podría estar implicado en la regulación de la homeostasis energética.

En un estudio reciente, ratones transgénicos sobreexpresando *agouti* en tejido adiposo mostraron sobrepeso sin alteración de su ingesta, indicando que el aumento de su grasa corporal puede ser secundario a alteración de su metabolismo energético. Este hallazgo tiene especial relevancia porque sugiere que la expresión de *agouti* en el tejido adiposo humano tiene importancia fisiológica.

- La rata Zucker (*fa/fa*)

Los animales homocigotos para el alelo *fa* (receptor de la leptina no funcionante) son apreciablemente obesos ya a las 3 a 5 semanas de vida. Para la semana 14, su composición

corporal consta de más de un 40% de lípidos. La obesidad se hereda de modo recesivo y los animales afectados son hiperlipidémicos, hipercolesterolémicos e hiperinsulinémicos, y desarrollan hipertrofia e hiperplasia adipocitaria, semejando la obesidad humana, por ello la rata Zucker es el mejor conocido y más ampliamente usado modelo genético de obesidad humana de comienzo precoz. La rata ZDF presenta tanto resistencia a la insulina (como resultado del receptor mutado de leptina, que causa obesidad), como inadecuada compensación por parte de la célula β . Esto último parece depender de un defecto

transcripcional en la célula β , que se hereda independientemente de la mutación del receptor de la leptina y la resistencia a la insulina. Las ratas con genotipos homocigoto dominante (+/+) y heterocigoto (*fa*/+) no presentan obesidad ni hiperglicemia.

Modelos inducidos:

Inducción hormonal

La administración de corticoides en diversos períodos de la vida del animal puede causar un estado similar a la DM2 humana, este modelo sería especialmente apropiado para el estudio de la DM2 que aparece en humanos trasplantados o en tratamiento esteroideo crónico por otro motivo. Otras hormonas que pueden causar hiperglicemia en animales son la somatostatina, el glucagon, las catecolaminas y la tiroxina.

Administración de fármacos

Otros modelos están basados en la administración de determinadas sustancias con efectos tóxicos sobre las células β . Por ejemplo, la estreptozotocina (STZ), un antibiótico utilizado en la quimioterapia del cáncer, induce DM2 en roedores recién nacidos no predispuestos, mediante la destrucción de sus células β . Otro fármaco utilizado a veces con el mismo fin es el aloxano.

La sensibilidad a la STZ varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. El modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. Una única dosis importante de estreptozotocina puede inducir diabetes en roedores, probablemente debido a efecto tóxico directo.

De modo alternativo, se puede usar en forma de múltiples dosis pequeñas. Administrada de este modo, induce una diabetes insulínopénica en la que interviene el sistema inmune, tal como ocurre en la diabetes DM1 humana. El modelo de baja dosis múltiple de estreptozotocina ha sido ampliamente utilizado para estudiar los acontecimientos inmunológicos que conducen a la insulinitis y muerte celular β , sin embargo, sigue produciendo diabetes incluso en ausencia de células T y B funcionantes, lo que sugiere que, aún a estas dosis, permanece cierto grado de toxicidad sobre las células β , predisponiéndolas al fracaso en presencia de algún tipo de sobrecarga o simplemente con el tiempo. De este modo, se ha utilizado el modelo de administración neonatal de STZ como modo de producir un modelo de DM2 en los roedores ya adultos.

La principal ventaja de los modelos basados en administración de fármacos es que el grado de alteración de las células β puede ser regulado de acuerdo con la dosis de toxina administrada. Su gran desventaja reside en que rara vez la diabetes humana es causada por un tóxico de este tipo.

Manipulación genética

La introducción de las técnicas de biología molecular dio lugar a la aparición de un gran número de modelos animales útiles para el estudio de la DM2. Este tipo de modelos se ha desarrollado especialmente en ratones debido a que hay más herramientas moleculares y tecnologías disponibles para esta especie.

Los tipos de manipulaciones que afectan a un gen específico y que pueden interesar para producir un modelo son:

- a) Sobreexpresión, da lugar a ratones llamados transgénicos.
- b) Eliminación: da lugar a ratones llamados “knock-out”.
- c) Reemplazo (con una forma alterada): da lugar a ratones llamados “knock-in”.

Los modelos transgénicos se obtienen mediante la incorporación de un gen modificado (transgen) en el pronúcleo de un oocito fertilizado, siendo implantado posteriormente éste en una madre adoptiva. El transgen se incorpora de modo aleatorio en el genoma y sólo una pequeña proporción de oocitos fertilizados dará lugar a una primera generación que expresa el gen de interés.

Para obtener animales “knock-out” y “knock-in” se elimina, altera o sustituye el gen correspondiente en células troncales embrionarias, las cuales se inyectan en un embrión precoz, en el cual se integran, dando lugar a animales quiméricos. En los animales en los que las células descendientes de las inyectadas dan lugar a línea germinal, el gen de interés estará en sus gametos y pasará a la descendencia. Con cruces selectivos obtendremos animales con una o con ambas copias del gen alteradas.

**** Modelos análogos y modelos intrínsecos:** Los modelos análogos son útiles como sustitutos de la enfermedad humana, y permiten hasta cierto punto hacerla accesible a la experimentación. Los modelos intrínsecos, a diferencia de los anteriores no tratan de imitar la enfermedad humana, sino que sirven para contestar preguntas concretas de aspectos específicos de la misma. **

4. COMITES ÉTICOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Es obvio que la experimentación animal es necesaria para la investigación de enfermedades y avance con el propósito de mejorar al máximo el tratamiento y la calidad del enfermo. Igualmente obvio es que durante el proceso de experimentación animal, se realizan numerosas pruebas a los animales que les causan dolor, estrés, enfermedad y que acaban con la eutanasia de los mismos, lo que choca con los derechos que estos animales deberían tener.

Es por ello que para intentar conciliar tan variadas posturas se crearon los Comités de Ética, constituidos por expertos en experimentación con diferentes puntos de vista.

OPOSICIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

La investigación médica por medio de experimentación animal era ya una cuestión clásica en la Medicina del siglo XIX, y es uno de los elementos que señala la conocida obra de Claude Bernard *Principes de médecine expérimentale*. Y ya por esa época existen movimientos de oposición a dicho empleo.

Sin embargo, la utilización de animales en investigación, históricamente reciente en Medicina, se ha visto acompañado de controversias y campañas denigratorias. Estos sucesos han hecho reflexionar a los investigadores sobre la licitud de estas intervenciones con los animales; de dicha reflexión y de las presiones de los grupos defensores de los animales se deriva el moderno desarrollo de las normativas y comités de ética para la experimentación animal (CEEA), así como de la legislación específica.

Dejando aparte las ideas subyacentes, indudablemente, la reacción contra la experimentación animal del siglo XIX puede asociarse sin esfuerzo con la brutalidad de toda intervención quirúrgica en dicha época, en que no existió anestesia, ni para los animales ni para los hombres, hasta finales del siglo. Esto nos lleva a un contexto más de reacciones afectivas que racional. La negativa a la experimentación animal sería, desde este punto de vista, manifestación del sentimiento de repulsión que, lógicamente, se produce al ver el sufrimiento físico.

El activismo anti experimentación animal

En el grupo de los moderados podemos incluir varios movimientos, como puede ser el PETA (People for the ethical treatment of the animals), o The Humane Society of the United States;

sus líneas de razonamiento, aunque sólo superficialmente fundamentadas en el deber de evitar el sufrimiento inútil de los animales, vienen a coincidir entre ellas, y comparten la base que hemos mencionado, fundamentalmente afectiva, de la reacción contra el maltrato de los animales.

La liberación animal

Además de estos planteamientos denominados moderados, se pueden observar otras actitudes contra la experimentación animal mucho más agresivas. En este caso, sí que suele existir una fundamentación teórica, no es una mera cuestión de sentimientos; cuestión distinta es si dicha fundamentación es sólida desde el punto de vista lógico o filosófico. Por limitarnos a un ejemplo bien conocido, mencionaré genéricamente los movimientos de liberación animal, cuya fuente teórica más conocida se encuentra en la obra de Peter Singer *Animal Liberation*. Sus ideas de fondo se podrían resumir del modo siguiente:

Los animales son, como nosotros, seres vivos, pertenecientes a la naturaleza; no existe ninguna diferencia cualitativa radical entre el hombre y los demás seres vivos; todos son un cúmulo de células autoconciencia, son capaces de sentir y de sufrir del mismo modo que los humanos.

ALF: Animal Liberation Front

Singer no está solo en la defensa de estas ideas radicales. Quizá el grupo más conocido que intenta difundirlas es el Animal Liberation Front, con presencia activa en Internet, actuando mediante la acción directa: liberación de animales «presos» en laboratorios, sabotajes de centros de experimentación donde se emplean animales, etc. Y no sólo liberaciones dirigidas a animales de experimentación, sino también a granjas de animales de carne, como pollos o cerdos, o de la industria peletera, como visones, los cuales, al ser una especie invasora en nuestro país, causan graves daños a la fauna autóctona.

También existen otros grupos en defensa de la experimentación animal. Sirvan algunos ejemplos:

- Anima Naturalis, <http://www.animanaturalis.org>
- Animal Freedom, <http://www.animalfreedom.org>
- ADDA (Asociación en defensa de los derechos de animal), <http://www.addaong.org>
- ANDA(Asociación nacional para la defensa de los animales), <http://andacentral.org>

Planteamientos científicos anti experimentación animal

Existe otro frente extraordinariamente interesante desde el punto de vista teórico, que plantea su negativa a la experimentación con animales de laboratorio sobre razones científicas serias.

Básicamente, podría resumirse en una sola afirmación: los animales no son hombres y, por tanto, los experimentos realizados sobre animales no son extrapolables al hombre. Por contra de lo que pudiera parecer, quienes defienden esta postura son, con frecuencia, científicos con larga experiencia en experimentación animal, y no hablan por teorizar, sino desde esa experiencia y con datos que han recabado de publicaciones científicas de primera línea. La conclusión que obtienen es muy sencilla: el paralelismo entre la reacción de un organismo animal a un medicamento que experimentamos por primera vez y la reacción del organismo

del hombre coinciden por casualidad. No existe ningún dato *a priori* que nos permita tener garantías reales de que dicha reacción va a ser la misma. *A posteriori*, sí que podemos afirmarlo en cada caso concreto, tras probar el medicamento tanto en el animal como en el hombre y ver que los efectos son equivalentes. Pero también podríamos obtener una inacabable enumeración de casos en los que, *a posteriori*, se sabe que dichas reacciones son distintas; o que son radicalmente distintas entre distintas especies animales.

Dentro de esta corriente científica anti experimentación animal podemos mencionar un par de instituciones, como pueden ser el Medical Research Modernization Committee, que ha publicado un detallado informe al respecto⁷, o el grupo Doctors and Lawyers for Responsible Medicine, que ha publicado varios artículos interesantes.

COMITÉS ÉTICOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEEAA)

Con el objetivo de que la legislación establecida fuese respetada se crearon los Comités de Ética o Comités Éticos, formados por expertos en experimentación con puntos de vista diferentes. El primer país en crear estas comisiones fue Suecia en 1979, seguido por EEUU en 1984. Su función es aprobar o denegar la realización de un experimento en función de una serie de parámetros estudiados; los miembros de estas comisiones deben ser capaces de evaluar la naturaleza y las consecuencias (entre otras cosas para el bienestar de los animales) de cada experimento, teniendo en cuenta tanto los aspectos éticos como los intereses científicos, legales, económicos y comerciales.

Además, han demostrado ser un elemento útil en la transmisión de las exigencias legales a los investigadores. Deben facilitar al científico toda la información que necesite relacionada con el tema, además de establecer mecanismos que permitan agilizar la revisión de los protocolos y reducir al máximo el tiempo que ha de emplear el investigador para cumplir con las exigencias burocráticas.

La legislación estatal española no contempla la creación de Comités de Ética, ni constitucionales ni centrales. En Cataluña, la Ley 5/1995 contempla los CEEAA en varios puntos:

Artículo 21. Obliga a los centros usuarios a crear un CEEAA, que deberá velar por el cuidado y bienestar de los animales. Algunos de sus miembros no tendrán relación directa con el centro o con el procedimiento de experimentación que se ha de tratar.

Artículo 22. Se cataloga como infracción grave (sancionable con multas de hasta 12.000 euros) el hecho de no disponer de CEEAA o de incumplir las exigencias establecidas por el reglamento en esta materia.

Artículo 25. Establece que si un miembro de un CEEAA comete una infracción, ello supone su separación e inhabilitación para integrarse en otros CEEAA en un futuro.

Esta Ley ha sido desarrollada posteriormente mediante el Decreto 214/1997 a través del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca (DAGP) de la Generalitat de Cataluña. En él se contemplan los siguientes aspectos:

- Composición: los Comités de Ética están integrados por un mínimo de tres personas, con conocimientos y experiencia para evaluar el bienestar y cuidado de los animales, las instalaciones y los procedimientos:
 - o Un asesor en bienestar de los animales.
 - o Un representante de la Unidad de Garantía de Calidad.
 - o Una persona con conocimientos y experiencia en bienestar animal, no implicada en el procedimiento. Pueden formar parte del CEEA personas no vinculadas al centro.
- Funciones a desarrollar por los CEEA:
 - o Evaluar la idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio.
 - o Evaluar la posibilidad de obtener conclusiones válidas.
 - o Garantizar que se utiliza el menor número posible de animales.
 - o Garantizar que se han considerado las posibles técnicas alternativas.
 - o Evaluar la idoneidad de las especies seleccionadas, determinando si constituyen el mejor modelo biológico.
 - o Elaborar un informe sobre la idoneidad de los protocolos y especies seleccionadas.
 - o Velar por que los animales no sufran innecesariamente y se les proporcionen los analgésicos y anestésicos necesarios.
 - o Controlar que se utilicen métodos eutanásicos adecuados.
 - o Velar por que el personal esté capacitado y realice las tareas de forma eficaz.
 - o Revisar, modificar y aprobar los procedimientos.
 - o Suspender los procedimientos que no se ajusten a lo aprobado.
 - o Revisar los programas de cuidado y utilización de animales.
 - o Establecer programas de inspección que detecten y corrijan posibles deficiencias en las instalaciones o el cuidado de los animales.
- Normas por las que se rige el CEEA:
 - o Sus miembros respetarán el principio de confidencialidad.
 - o Se requiere unanimidad en las decisiones si el comité está compuesto por tres miembros, o mayoría absoluta si son más de tres.

- o Cuando sea necesario, se solicitará asesoramiento a personas expertas no pertenecientes al CEEA, que también respetarán el principio de confidencialidad.
 - o Aunque sean miembros del CEEA, no podrán intervenir las personas directamente implicadas en el procedimiento.
 - o En aquellos procedimientos que no requieran autorización expresa de la Administración, los informes del CEEA son vinculantes para el personal del centro usuario.
 - o Se adjuntará el informe del CEEA al notificar un procedimiento o solicitar autorización especial al DAGP.
- Autorización expresa por la administración: se requiere autorización expresa del DAGP de la Generalitat de Catalunya, además de la aprobación del CEEA, en los siguientes casos:
- o Utilización de animales de las especies incluidas en el Anexo I de la Ley 5/1995 que no procedan de centros oficialmente reconocidos.
 - o Uso de animales salvajes capturados en la naturaleza, protegidos o en vías de extinción.
 - o Realización de procedimientos fuera de los centros registrados.
 - o Liberación de animales durante el procedimiento de experimentación.
 - o Realización de procedimientos sin utilizar anestesia o analgesia por ser incompatibles con los resultados perseguidos por el procedimiento.
 - o Liberación al medio originario de animales capturados en la naturaleza que han sido utilizados en procedimientos.
 - o Utilización en procedimientos de experimentación de animales previamente sometidos a otro procedimiento.
 - o Ejecución de procedimientos en los que el animal puede sufrir un dolor intenso y prolongado.

COMITÉ ESPAÑOL ICLAS

El Comité Español ICLAS (CE ICLAS), auspiciado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, se engloba dentro de los Comités Nacionales ICSU (*Internacional Council for Science*) y tiene entre sus funciones promover la actividad científica en las diferentes ramas de la ciencia relacionada con la investigación y bienestar de los animales, junto con el intercambio de información e ideas de forma armonizada en todo el territorio nacional.

El CE ICLAS, está constituido por expertos con promoción internacional, provenientes de diferentes áreas de la experimentación animal así como de alternativas a la misma.

Introducción y exposición de motivos

El Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre de 2005, *sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos (en adelante Real Decreto)*, basado en la Directiva 86/609/CEE de la Unión Europea (*en adelante Directiva*), y el Convenio ETS 123 del Consejo de Europa (*en adelante Convenio*), requiere en su Artículo 9 que “las personas que lleven a cabo procedimientos de experimentación y las personas que estén al cuidado de los animales utilizados en ellos, tengan una formación acreditada mediante un título académico considerado adecuado por la Autoridad Competente”, que les permita realizar su actividad en una de las cuatro categorías profesionales establecidas.

Por otro lado la Ley 32/2007, de 7 de noviembre de 2007, *para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio* considera como infracción, el incumplimiento de las obligaciones exigidas por las normas de protección animal en cuanto al cuidado y manejo de los animales, por lo que la falta de formación del Personal que trabaja con animales de experimentación constituye una infracción.

El Anexo I del Real Decreto incluye 4 categorías profesionales:

1. **Categoría A:** Personal para el cuidado de los animales.
2. **Categoría B:** Personal que lleva a cabo los procedimientos.
3. **Categoría C:** Personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos.
4. **Categoría D:** Personal especialista en ciencias del animal de experimentación con funciones de asesoramiento sobre el bienestar y salud de los animales.
 - a) Categoría D1: Personal especialista en bienestar animal.
 - b) Categoría D2: Personal especialista en salud animal.

En abril de 2006 finalizó el plazo para poder solicitar a la Autoridad Competente la homologación de aquel personal que acreditara suficientemente una experiencia demostrable en las tareas y funciones previstas en el artículo 9.1 y en el Anexo I del Real Decreto, durante el periodo estipulado para cada categoría profesional.

A partir de esa fecha, toda persona que no hubiera podido acogerse a dicha excepción, tiene que haber recibido necesariamente, y demostrar, una formación específica, que le permita acreditarse ante la Autoridad Competente, para poder realizar las funciones inherentes a su categoría profesional dentro del ámbito de la experimentación animal. Dicha formación, debido a su complejidad y especificidad, no ha sido regulada hasta el momento, por lo que quedan por definir aspectos tales como el desarrollo de los temas, su duración en cada categoría o la cualificación del profesorado.

Situación desde la aprobación del RD 1201/2005

La situación inicial transitoria del personal relacionado con el animal de laboratorio desde la aprobación del Real Decreto, es la siguiente:

- El Real Decreto describe la formación académica previa requerida para las categorías C y D en términos de licenciatura, cuando esta denominación ya no existe en las nuevas titulaciones adaptadas al Espacio Europeo de Educación superior.
- Existen Comunidades Autónomas que ya validan cursos para acreditar al alumnado que los recibe, sin que exista una coordinación a nivel nacional entre las mismas.
- Estos cursos se guían por las recomendaciones de FELASA (Federación de Asociaciones Europeas para las Ciencias del Animal de Laboratorio).
- Hay licenciados universitarios que han recibido la formación para la Categoría B como paso previo a obtener la Categoría C, mientras que en otras Comunidades se ofrece la formación en la Categoría C de forma directa sin pasar previamente por la B.
- Los grupos de investigación, si financian alguna formación a sus investigadores noveles, lo hacen preferentemente de aquella relacionada con la Categoría B, por lo que posteriormente estos investigadores necesitarán obtener la Categoría C.

Consideraciones generales

Condiciones comunes para los programas de formación

1. **Dirección:** Los programas formativos deben estar dirigidos por personal acreditado en las categorías C o D.
2. **Profesorado:** Los cursos deben ser impartidos por profesorado cualificado en la materia asignada.
3. **Formación Teórico-práctica:** Los programas deben dividirse en una parte de teoría y otra de práctica estrechamente relacionadas entre sí, ya que la mayoría de los temas impartidos necesitan que el alumnado sepa aplicar los conocimientos adquiridos. Éstos conocimientos serán obtenidos a través de:
 - a) Exposiciones teóricas, incluyendo una demostración mediante sistemas audiovisuales (imágenes, videos) de los procedimientos que deben conocerse y practicarse.
 - b) Discusión, con el profesorado de supuestos prácticos a resolver en grupo. Presentación tutelada de los supuestos tras la discusión entre los alumnos.
 - c) Ejecución práctica, de acuerdo con cada categoría, de los principales procedimientos realizados en animales de laboratorio, realizada en unas instalaciones adecuadas para el empleo de animales.

4. **Animales:** Se utilizarán modelos alternativos siempre que sea posible. En caso de ser imprescindible la utilización de animales en la docencia, todos los procedimientos con animales que se realicen durante el curso, deberán restringirse a lo absolutamente necesario para la formación del alumnado, con el objeto de reducir al máximo el número de animales empleados y el sufrimiento de los mismos. El empleo de estos animales deberá haber sido aprobado por el comité de ética de la institución correspondiente.
5. **Instalaciones:** Es imprescindible que la parte práctica de los cursos en la que se utilicen animales sea llevada a cabo solamente en instituciones que cuenten con un animalario registrado, aunque no es necesario que se realicen en las propias instalaciones del mismo. La presencia de dicho animalario asegura la existencia de un comité de ética en la institución, el cual deberá aprobar el empleo de animales durante el curso.

COMITÉS ÉTICOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (EN CATALUÑA)

Artículo 26. Creación de los Comités Éticos de Experimentación Animal.

Los centros usuarios están obligados a crear Comités Éticos de Experimentación Animal, los cuales deben velar por el cuidado y el bienestar de los animales de experimentación.

Artículo 27. Composición de los Comités Éticos de Experimentación Animal.

Los Comités Éticos de Experimentación Animal deben estar integrados por un mínimo de 3 personas con experiencia y conocimientos para velar por el bienestar y el cuidado de los animales, las instalaciones y los procedimientos de experimentación. Los miembros que, como mínimo, deben formar parte de estos comités, serán los siguientes:

- a) El asesor en bienestar animal del centro.
- b) Un representante de la unidad de garantía de calidad del centro, cuando exista, o en defecto, un investigador del centro no directamente implicado en el procedimiento que deba informarse.
- c) Una persona con experiencia y conocimientos en bienestar de los animales que no tenga relación directa con el centro o con el procedimiento de que se trate.

Artículo 28. Funciones de los Comités Éticos de Experimentación Animal. Son las siguientes:

- a) Informar sobre la realización de los procedimientos de experimentación, previa evaluación de la idoneidad del procedimiento en relación con los objetivos del estudio, la posibilidad de alcanzar conclusiones válidas con el menor número posible de animales, la consideración de métodos alternativos a la utilización de los animales y la idoneidad de las especies seleccionadas.
- b) Velar para que los animales no sufran innecesariamente y para que se les proporcione, analgésicos, anestésicos u otros métodos cuando sea necesario, destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia.

- c) Controlar que se utilicen métodos eutanásicos humanitarios.
- d) Velar para que el personal que participa en los procedimientos esté preparado para llevar a cabo las tareas encargadas.
- e) Revisar procedimientos ya evaluados o suspender cualquier procedimiento ya iniciado que no se ajuste a los requisitos que establece el protocolo.

Artículo 29. Funcionamiento de los Comités Éticos de Experimentación Animal

Los Comités Éticos de Experimentación Animal deben regirse por las siguientes normas generales de funcionamiento:

- a. Sus miembros respetarán el principio de confidencialidad.
- b. La aprobación de la realización de los procedimientos de experimentación requerirá las mayorías siguientes:
 - b) Si el Comité está formado por 3 miembros, los acuerdos deberán tomarse por unanimidad y si son más de tres por mayoría absoluta.
 - c) Cuando se considere oportuno, solicitarán el asesoramiento de personas expertas que no pertenezcan al Comité ético de experimentación animal, las cuales respetarán el principio de confidencialidad.
 - d) El investigador directamente implicado en el procedimiento o el personal colaborador en el procedimiento no podrán participar en la toma de decisiones sobre la aprobación de los procedimientos, aunque sean miembros del Comité Ético de Experimentación Animal.
 - e) En el caso de procedimientos que no requieran autorización por parte del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, los informes del Comité Ético de Experimentación Animal serán vinculantes para el centro usuario.

Artículo 31. Control de los centros eximidos de la creación de Comités Éticos de Experimentación Animal.

31.1. En los centros eximidos de la creación del Comité Ético de Experimentación Animal el personal asesor en bienestar animal realizará las funciones establecidas en el artículo 28 de este Decreto.

31.2. El Departamento de Agricultura Ganadería y Pesca establecerá un plan para los centros eximidos de Comités Éticos de Experimentación de controles animal en función de cada tipo de centro y realizará inspecciones periódicas para comprobar el cumplimiento de lo que establece este Decreto.

Control en la utilización de animales de experimentación

Artículo 32. Notificación de procedimientos.

La utilización de animales de experimentación con las finalidades que se establecen en el artículo 2 de la Ley 5/1995, y que no requiere autorización para su realización, debe ser notificada previamente a la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca. La notificación es válida durante dos años, si no hay modificación en el procedimiento y se puede renovar a petición del usuario.

Artículo 33. Documentación a presentar para la notificación de procedimientos.

- a) Memoria descriptiva del procedimiento, en la que se hará constar:
 - i. Los objetivos que se persiguen.
 - ii. La metodología del procedimiento. En caso de que las líneas directivas de un procedimiento estén publicadas con carácter oficial o hayan sido oficialmente validadas, se considerará cumplimentado este extremo siempre que se aporte una copia de la publicación o validación correspondiente.
 - iii. La especie y el número de animales que se utilizarán.
 - iv. El tiempo aproximado de duración del procedimiento y frecuencia con que se realizará.
 - v. Destino final de los animales y, en caso de sacrificio, el método a utilizar.
 - vi. La identificación del personal investigador responsable del procedimiento.
- b) Informe del Comité ético de experimentación animal.
- c) Los centros usuarios universitarios y los centros públicos de investigación deberán presentar además, la relación de personal experimentador y de personal investigador implicados en el procedimiento con especificación de su formación y titulación y, si procede, experiencia.

Artículo 34. Autorización de procedimientos.

De acuerdo con lo que establece el artículo 17.2 de la Ley 5/1995, requiere autorización expresa del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca:

- a) La utilización de animales de las especies incluidas en el anexo 1 de la Ley 5/1995, que no hayan nacido ni hayan sido expresamente criados en centros oficialmente reconocidos.
- b) La utilización de animales salvajes capturados en la naturaleza y de animales protegidos o en peligro de extinción, si lo permite la normativa específica de protección, siempre que los objetivos del procedimiento sean la investigación que tienda a la protección de estas especies o a otros fines biomédicos esenciales y se compruebe que las citadas especies son excepcionalmente las únicas adecuadas para la finalidad que se pretende. Se excluyen las actividades científicas relacionadas con el anillado, el marcaje, y la toma de muestras para análisis rutinarios.
- c) La ejecución de procedimientos de experimentación fuera de los centros usuarios.

- d) La liberación de los animales durante el procedimiento de experimentación.
- e) La realización de procedimientos en los que no se utiliza anestesia, analgesia u otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia, por ser incompatibles con los resultados perseguidos por el procedimiento o por estar contraindicada.
- f) En aquellos procedimientos de experimentación en los que se han utilizado animales capturados en la naturaleza, la liberación al medio originario de estos animales.
- g) La ejecución de procedimientos de experimentación en que el animal puede sufrir un dolor grave y prolongado.
- h) La realización de procedimientos en el supuesto previsto en el artículo 37.2 de este Decreto.
- i) La utilización en procedimientos de experimentación de animales que hayan sido sometidos previamente a otro procedimiento.

5. ALTERNATIVAS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Desde el momento en el que se asumió que la experimentación animal era algo necesario, como proclamó Bernard Claude en “*An introduction to the study of Experimental Medicine*” (1865) relacionando dicha necesidad con una homeostasis que no se puede conseguir *in vitro*, se consideró fundamental reducir el dolor y el estrés sufrido por estos animales. Fue por ello que en 1959 William Russell y Rex Burch publicaron *The Principles of Humane Experimental Technique*, donde incluyeron los principios para la búsqueda de alternativas a la experimentación animal. Estos principios se basaron en el concepto de las tres “Rs”:

- Reducción: la reducción en el número de animales empleados en cada experimento se consigue, por ejemplo, diseñando con precisión las diferentes etapas del experimento, limitando el número de variables, empleando una población genéticamente homogénea, controlando y manteniendo en todo momento las condiciones prefijadas, maximizando la información obtenida a partir de cada animal y limitando su uso en etapas intermedias.
- Reemplazo: hace referencia a la sustitución en la medida de lo posible de animales vivos por otros métodos alternativos. En general, las alternativas de sustitución pueden ser divididas en las siguientes categorías:
 - o Información.
 - o Modelos matemáticos y químicos evaluados por ordenador.
 - o Técnicas fisicoquímicas.
 - o Uso de organismos de menor escala biológica (con menor capacidad de percibir el dolor, como gusanos o bacterias) y estados embrionarios.
 - o Estudios en humanos y cultivos de células, tejidos y órganos.

Por poner un ejemplo, un laboratorio que investiga compuestos antivirales redujo el número de ratones empleados a lo largo de 15 meses, de 13.000 a 2.000 y aumentó el número de sustancias químicas ensayadas desde 2.000 a 24.000 con la introducción de cultivos tisulares.

- Refinamiento: de manera que se consiga reducir el dolor y el estrés sufrido por los animales empleados mejorando sus condiciones de alojamiento, utilizando aquellos procedimientos más adecuados, menos invasivos y que duren lo menos posible y, una vez que ha terminado el experimento, utilizando el método de eutanasia más adecuado. En casos extremos también se debe tener en cuenta la posibilidad de detener el experimento si se considera que las condiciones de los animales no son las adecuadas y que el dolor que están experimentando es excesivo. Estas consideraciones no son solo importantes desde el punto de vista de la ética sino también desde el del buen desarrollo del experimento, ya que el dolor y el estrés dan

lugar a cambios fisiológicos que pueden incrementar la variabilidad de los resultados experimentales.

Hasta la fecha, la R en la que se ha conseguido un avance real es la de la mejora de las condiciones de dichos procedimientos, prestando especial atención al bienestar de los animales empleados fomentando la participación de personas especializadas en ellos (punto en el que juegan un papel fundamental los veterinarios) y siguiendo las directrices establecidas en la legislación y los diferentes códigos de ética creados hasta el momento. Es gracias a esta mejora en el conocimiento de los animales empleados y a la realización de estudios eficaces y seguros que se pueden encontrar alternativas que presenten unas características tales que los reemplacen perfectamente, reduciendo así el total de animales empleados para llevar a cabo dicho experimento.

Lo que ocurre es que no siempre está claro hasta qué punto estas técnicas pueden sustituir el uso de animales según el tipo de experimento concreto que se esté llevando a cabo. Probablemente, en muchos casos será necesario buscar el método alternativo para cada experimento, y quizás en muchas ocasiones no sea posible. Aunque se han producido tremendos avances en las técnicas de cultivo de células y tejidos y la biología molecular provee de un enorme potencial para las investigaciones biomédicas, los sistemas *in vitro* están limitados por la falta de un mecanismo sistémico integrado para absorción, distribución, metabolismo y excreción y por el hecho de que estos modelos no están disponibles para todos los tejidos y órganos. Sin embargo, las ventajas pueden ser considerables pues los tejidos humanos pueden ser usados en estos sistemas *in vitro*, produciendo resultados que obviamente son más relevantes para la condición humana y anulan la necesidad de realizar extrapolaciones de otras especies. A medida que aumenta el conocimiento del hombre sobre la biología, las probabilidades de desarrollo de métodos alternativos adecuados son considerablemente mayores.

Por lo tanto, en el momento en el que un investigador comienza el diseño de un nuevo experimento en primer lugar debe valorar cada uno de los métodos alternativos existentes. En caso de que, aunque sea parcialmente, necesite del uso de animales, deberá asegurar en todo momento el cumplimiento del protocolo de las tres “Rs”, teniendo en cuenta su aceptación a nivel mundial. Para ello, deberán realizar una meticulosa revisión de toda la literatura anterior relacionada con el tema tratado, estandarizar todos los procedimientos relacionados con el experimento, escoger los métodos estadísticos apropiados y llevar a cabo un estudio piloto previo empleando muy pocos animales para controlar por completo cada uno de los detalles. También será fundamental la elección del animal que mejor se adapte a su experimento, ya que toda la información que obtenga dependerá de esta elección, y además de la salud y el bienestar de los ejemplares a lo largo de todo el procedimiento.

6. COMPARATIVA DE CIFRAS EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Debido al control que se debe realizar y presentar al Consejo y al Parlamento Europeo, de conformidad con el artículo 26 de la Directiva 86/609/EEC, damos los datos estadísticos relativos al número de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la UE.

En las siguientes tablas comparativas podemos apreciar una considerable disminución del número de ejemplares que se han utilizado en un periodo de tiempo comprendido entre el año 1999 y el 2003. Es de suponer que las asociaciones en defensa de los derechos de los animales, así como un control más estricto de los comités de ética tienen mucho que ver con estos resultados tan favorables para los animales de experimentación.

En España podemos apreciar una reducción muy notable observando las tablas que vienen a continuación, facilitados por el *“Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Subdirección General de Sanidad Animal”*, comparando 1999-2003, en las que se aprecia una **notable reducción** del número de ejemplares. A continuación veremos una serie de tablas que reflejaran dichos datos.

CUADRO 1: NUMERO DE ANIMALES UTILIZADOS SEGÚN LA PROCEDENCIA

Especies por procedencia

1.1	1 2	1	1 4	1	1 6	1
Especie	total	Animales procedentes de esta cr a o esta lecimientos suministradores registradores en el pa s informador	Animales procedentes de otras fuentes de la E	Animales procedentes de pa ses onse o de Europa son partes del on enio E (con e cepci n de los Estados Miem ros de la E)	Animales procedentes de otras fuentes	Animales reutili ados
1 a atones (<i>Mus musculus</i>)	21	0	162	22	41	
1 atas (<i>Rattus norvegicus</i>)	12 4	11 62	104	0	16	
1 c o a as (<i>Cavia porcelus</i>)	16 0	14 21	24	0	0	
1 d H msters (<i>Mesocricetus</i>)	0		1	0	0	
1 e tros roedores (<i>Rodentia</i>)	2 4	0	0	0	0	
1 f one os (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	11	11111	6	0	0	
1 g Gatos (<i>Felis catus</i>)	16	4	0	0	4	
1 Perros (<i>Canis familiaris</i>)	6	2	1 1	0		
1 i Hurones (<i>Mustela putoris furo</i>)	2	1	2	0	0	
1 tros carn oros (<i>Carnivora</i>)	0	0	0	0	0	
1 k a allos, asnos e ridos (<i>Equidae</i>)	42	0	0	0	0	
1 l erdos (<i>Sus</i>)	4 1	0	0	0	0	
1 m a ras (<i>Capra</i>)	11	0	0	0	0	
1 n e as (is)	21	0	0	0	0	
1 o acas (<i>Bos</i>)	2 4	0	0	0	0	
1 p Prosimios (<i>Prosimia</i>)	0	0	0	0	0	
1 Platirinos (<i>Cebioidea</i>)	1	0	1	0	0	
1 r atarinos (<i>Cercopithecoidea</i>)	1	2	2	0	0	
1 s Monos antropomorfos (<i>Hominoidea</i>)	2	2	0	0	0	
1 t tros mam feros (<i>Mammalia</i>)	60	0	0	0	0	
1 u odornices (<i>Coturnix coturnix</i>)	1	1	0	0	0	
1 tras a es (<i>Aves</i>)	424	0	0	0	0	
1 eptiles (<i>Reptilia</i>)	10	0	0	0	0	
1 Anfi ios (<i>Amphibia</i>)	41	0	0	0	0	
1 Peces (<i>Pisces</i>)	0 4	0	0	0	0	
1 A		4 141	4 62	22	24	

Nota 1: La columna 1.5 se refiere únicamente a los países miembros del Consejo de Europa que, al principio del período de referencia, son Partes en el Convenio ETS 123. Para completar esta columna debe, por tanto emplearse una lista actualizada de dichos países.

Nota 2: Rellénese sólo las casillas de fondo blanco

Nota 3: El número de animales reutilizados (columna 1.7) debe sustraerse del total recogido en la columna 1.2

CUADRO 2: NUMERO DE ANIMALES UTILIZADOS EN EXPERIMENTOS PARA FINES CONCRETOS

Fines por especies									
2 1	2 2	2	2 4	2	2 6	2	Educaci n	2	2 10
Especie	Estudios de iolog a fundamental	In stigaci n desarrollo de productos e instrumentos e odontolog a eterinaria (e cluida la e aluaci n de la seguridad-to icolog a de otros tipos-, ue figura en la columna 2 6)	Producci n control de calidad de productos e instrumentos de medicina odontolog a	Producci n control de calidad de productos e instrumentos de eterinaria	E aluaciones de la seguridad (to icolog a otros tipos, incluida la e aluaci n de la seguridad de productos e instrumentos de medicina, odontolog a eterinaria)	Diagn stico de enfermedades	Formaci n	tros	otal
2 a atones	1 0	11 641	66 0	1	62 2	140	2	11 00	40 1
2 atas	1	0	2204	10		2 2	0	2 4	11
2 c o a as	42	4	1142	10	10	2	2	1	16 0
2 d H msters	4	2	0	264	0		12	0	0
2 e tros roedores	100	166	0	0	0	0	2	0	2 4
2 f one os	4	26 4	0	2106	026	1	100	0	11
2 g Gatos	6		1	0	0	0			16
2 Perros	44	1	6	0	2 2		1	0	426
2 i Hurones	1	220	0	0	0	0	0	0	2
2 tros cam oros	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 k a allos, asnos e ridos	0	0	0	42	0	0	0	0	42
2 l erdos	2	1 1	0	21	6	40	1200		4
2 m a ras	16		0	0	24	0	0	2	11
2 n e as	1	4	0	1	62	0		2	21
2 o acas	0	104	0	1 0	0	0	0	0	2 4
2 p Prosimios	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 Platirinos	1	0	0	0	0	0	0	0	1
2 r atarrinos	2	21	0	0		0	0	0	1
2 s Monos antropomorfos	2	0	0	0	0	0	0	0	2
2 t tros mam feros	0	0	0	60	0	0	0	0	60
2 u odomices	1	0	0	0	0	0	0	0	1
2 tras a es	4	26 2	0	4 4	40	1	0	1200	424
2 Anfi ios	1	0	0	0	0	0	0	6	41
2 Peces	2 4	00	0	0	126	0	266	0	0 4
2 A	21 02	1 1 6	100	0216	1 1	6 4	160	1604	

CUADRO 3: NUMERO DE ANIMALES UTILIZADOS EN EVALUACIONES DE LA SEGURIDAD (TOXICOLOGÍA Y OTROS TIPOS)

Productos por especies

1	2	4	6	6	6	6	10	11		
Especie	Productos, sustancias o instrumentos de medicina, odontología o veterinaria	Productos o sustancias utilizados o destinados a utilizarse principalmente en agricultura	Productos o sustancias utilizados o destinados a utilizarse principalmente en la industria	Productos o sustancias utilizados o destinados a utilizarse principalmente en el hogar	Productos o sustancias utilizados o destinados a utilizarse principalmente como cosméticos o artículos de tocador	Productos o sustancias utilizados o destinados a utilizarse principalmente como aditivos alimentarios de uso humano	Productos o sustancias utilizados o destinados a utilizarse principalmente como aditivos alimentarios de uso animal	Contaminantes reales o posibles del medio ambiente en general que no figuren en otras columnas	Tras evaluaciones toxicológicas o de la seguridad	total
aves	21400	24	0	0	0	0	2	12	40	640
aves	0		6	0	0	0	0	2	1	6602
aves	2	0	6	0	0	0	0	0	160	10
animales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales roedores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales	1	0	111	0	0	0	0	0	4	41
Gatos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perros	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
murciélagos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
animales carnívoros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales, asnos e híbridos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales	2	0	0	0	0	0	0	0	1	266
animales	24	0	0	0	0	0	0	0	0	24
animales	62	0	0	0	0	0	0	0	0	62
animales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Primates	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Primates	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Monos antropomorfos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales mamíferos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales	40	0	0	0	0	0	0	0	0	40
animales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
animales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Peces	100	2	0	60	0	0	0	2	0	126
A	44	620	42	60	0	0	2	1	4226	1

CUADRO 4: NUMERO DE ANIMALES UTILIZADOS EN EXPERIMENTOS PARA ESTUDIOS SOBRE ENFERMEDADES HUMANAS Y ANIMALES

Categorías principales por especies

4 1	4 2	4	4 4	4	4 6	4
Especie	Enfermedades cardio asculares umanas	ranstornos ner iosos mentales umanos	ncer umano (sal o las e aluaciones de riesgos carcinog nicos)	tras enfermedades umanas	Estudios espec ficos de las enfermedades animales	otal
4 a atones	44	1 0	612	0 1		1 161
4 atas		1 26	1	60		
4 c o a as	44	2 6	110	6	2	1402
4 d H msters	0		2	46	14	2
4 e tros roedores	0	120	0	4	44	642
4 f one os	1 0		66	0	4 4	1 26
4 g Gatos	0	1	0		0	21
4 Perros	2	0		1	12	1
4 i Hurones	0	2	0	0	0	2
4 tros carn oros	0	0	0	0	0	0
4 k a allos, asnos e ridos	0	0	0	0	0	0
4 l erdos	2	1	21	46	420	11
4 m a ras	40	0	0		0	4
4 n eas	0	24	0	4		124
4 o acas	0	0	0	0	14	14
4 p Prosimios	0	0	0	0	0	0
4 Platirinos	0	1	0	0	0	1
4 r atarrinos	0		0	2	0	1
4 s Monos antropomorfos	0	0	0	2	0	2
4 t tros mam feros	0	0	0	0	0	0
4 u odornices	0	0	0	0	0	0
4 tras a es	0		0	0	1 00	1
4 eptiles	0	0	0	0	0	0
4 Anfi ios	0	4	0	0	0	14
4 Peces	0	1 2	200	00	66	46
4 A	12 46	2 26	6 2	11 16	11	26266

CUADRO 5: NUMERO DE ANIMALES UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS E INSTRUMENTOS DE MEDICINA, ODONTOLOGÍA Y VETERINARIA

Exigencias normativas por especies						
1	2	4	6			
Especie	ormas nacionales propias de un solo Estado Mlem ro de la E (1)	ormas de la E, inclu da la armacopea Europea (re uisitos) E) (2)	ormas de pa ses miem ros del de Europa (e cluida la E) (2)	tras normas	ual uier com inaci n de las anteriores (2 4)	in e igencias normati as
total						
a atones	66	21 1	0	0		24
atas	0	1 42	0	16 2	0	0
c o a as	0	40	0	10	0	4
d H msters	0		0	0	0	264
e tros roedores	0	0	0	0	0	0
f one os	2	1 6	0	0	0	1
g Gatos	0	0	0	1	0	0
i Hurones	0	0	0	0	0	6
Perros	0	0	0	0	0	0
tros cam oros	0	0	0	0	0	0
k a allos, asnos e ridos	0	42	0	0	0	0
l erdos	22		0	0	20	26
m a ras	0	0	0	0	0	0
n e as	0	1	0	0	0	0
o acas	0	1 0	0	0	0	1 0
p Prosimios	0	0	0	0	0	0
Platirinos	0	0	0	0	0	0
r atarinos	0	0	0	0	0	0
s Monos antropomorfos	0	0	0	0	0	0
t tros mam feros	0	60	0	0	0	0
u odomices	0	0	0	0	0	0
tras a es	0	4	0	6 1	0	1
epitiles	0	0	0	0	0	4
Anfi ios	0	0	0	0	0	0
Peces	0	0	0	0	0	0
A	0	2 1	0	424	2	1
						402 1

Ejemplos
5.2-Francia realiza pruebas para cumplir con un requisito específico británico (o francés).
Nota: Las columnas 5.2 a 5.5 se refieren a la normativa que establece la realización de los ensayos y no al organismo autor del método, la directriz o el protocolo de los mismos.

5.3: El Reino Unido realiza pruebas conforme a la legislación comunitaria.
Ejemplo: un ensayo exigido por la normativa francesa que se realiza en Bélgica con arreglo a un protocolo ISO ha de considerarse conforme a una exigencia normativa nacional (F) e incluirse en la columna 5.2 de los cuadros presentados por Bélgica.
5.4- España realiza pruebas para cumplir con un requisito específico noruego.
5.5- Polonia realiza pruebas para cumplir con un requisito específico norteamericano.
5.6-Alemania realiza pruebas para cumplir con un requisito suizo (y comunitario).

- Notas:**
- (1) Estados miembros de la CE: Alemania, Austria, Bélgica, Chipre, Dinamarca, Eslovenia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Países Bajos, Polonia, Portugal, Reino Unido,
 - (2) Países miembros del Consejo de Europa (excluida la CE): Albania, Andorra, Armenia, Azerbaijani, Bosnia-Herzegovina, Bulgaria, Croacia, Georgia, Islandia, Liechtenstein, exRep.yugoslava de Macedonia, Moldavia, Mónaco, Noruega, Rumanía, Rusia, San Marino

CUADRO 6: NUMERO DE ANIMALES UTILIZADOS EN EVALUACIONES DE LA SEGURIDAD (TOXICOLOGÍA Y OTROS TIPOS)

Exigencias normativas por especies									
6 1	6 2	6	6 4	6	6 6	6	6	6	6
Especie	ormas nacionales propias de un solo Estado Miembro de la E (1)	ormas de la E, incluida la armacopea Europea (requisitos)	ormas de países miembros del Consejo de Europa (excluida la E) (2)	tras normas	ual uier com inaciones anteriores (2 4)	in e igencias normati as	total		
6 a atones	0	1 2	0	441	46 1	602	640 1		
6 atas	6	11	0	1 0	2 1	1411	6602		
6 c o a as	41	0	0	2	24	0	10		
6 d H msters	0	0	0	0	0	0	0		
6 e tros roedores	0	0	0	0	0	0	0		
6 f one os	1	1 4	0	1	4 60	1 6	41		
6 g Gatos	0	0	0	0	0	0	0		
6 Perros	0	6	0	10	1 6	2	2 6		
6 i Hurones	0	0	0	0	0	0	0		
6 tros carn oros	0	0	0	0	0	0	0		
6 k a allos, asnos e ridos	0	0	0	0	0	0	0		
6 l erdos	6	244	0	0	16	0	266		
6 m a ras	0	24	0	0	0	0	24		
6 n e as	2	42	0	0	0	1	62		
6 o acas	0	0	0	0	0	0	0		
6 p Prosimios	0	0	0	0	0	0	0		
6 Platirinos	0	0	0	0	0	0	0		
6 r atarrinos	0	0	0	0	2	0	0		
6 s Monos antropomorfos	0	0	0	0	0	0	0		
6 t tros mam feros	0	0	0	0	0	0	0		
6 u odornices	0	0	0	0	0	0	0		
6 tras a es	0	0	0	0	0	40	40		
6 eptiles	0	0	0	0	0	0	0		
6 Anfi los	0	0	0	0	0	0	0		
6 Peces	0	0	0	2	11	0	126		
6 A	6	1 6	0	24 4	412	2	1 1		

Ejemplos
6.2-Francia realiza pruebas para cumplir con un requisito específico británico (o francés).
Nota: Las columnas 6.2 a 6.5 se refieren a la normativa que establece la realización de los ensayos y no al organismo autor del método, la directriz o el protocolo de los mismos.
6.3: El Reino Unido realiza pruebas conforme a la legislación comunitaria.
6.4- España realiza pruebas para cumplir con un requisito específico noruego.
6.5- Polonia realiza pruebas para cumplir con un requisito específico norteamericano.
Ejemplo: un ensayo exigido por la normativa francesa que se realiza en Bélgica con arreglo a un protocolo ISO ha de considerarse conforme a una exigencia normativa nacional (F) e incluirse en la columna 6.2 de los cuadros presentados por Bélgica.
6.6-Alemania realiza pruebas para cumplir con un requisito suizo (y comunitario).

- (1) Estados miembros de la CE: Alemania, Austria, Bélgica, Chipre, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Países Bajos, Polonia, Portugal, Reino Unido,
(2) Países miembros del Consejo de Europa (excluida la CE): Albania, Andorra, Armenia, Azerbaijani, Bosnia-Herzegovina, Bulgaria, Croacia, Georgia, Islandia, Liechtenstein, exRep.yugoslava de Macedonia, Moldavia, Mónaco, Noruega, Rumania, Rusia, San Marino

Notas:

CUADRO 8: NUMERO DE ANIMALES UTILIZADOS EN EVALUACIONES DE LA SEGURIDAD (TOXICOLOGÍA Y OTROS TIPOS)

Tipos de ensayo por productos															
1		2				4	6				10	11	12	1	
Productos	M todos de ensa o de la to icidad aguda su aguda (incluido el ensa o l mite)				Irritaci n cut nea	ensi illi aci n cut nea	Irritaci n ocular	icidad cr nica su cr nica	arcinogenicidad	o icidad para el desarrollo	Mutagenicidad	o icidad para la funci n reproductora	o icidad para ente rados no acuticos incluidos en otras columnas	tros	otal
	2 1	2 2	2 3	2 4											
	D 0 0	0 0	M todos letales no asados en los signos cl nicos												
a Productos, sustancias o instrumentos de medicina, odontolog a eterinaria	2 6	2 4	16	2 1	44	24		0	16	0	0	6	0	2 11	44
Productos o sustancias utilizados o destinados a utili arse principalmente en agricultura	2	0	0	0	0	0		0	0	24	0	0	0	0	620
c Productos o sustancias utilizados o destinados a utili arse principalmente en la industria	601	1	0	0	0	21	0	6	0	0	0	0	0	0	42
d Productos o sustancias utilizados o destinados a utili arse principalmente en el hogar	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	60
e Productos o sustancias utilizados o destinados a utili arse principalmente como cosm ticos o art culos de tocador	0	0	0	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
f Productos o sustancias utilizados o destinados a utili arse principalmente como aditivos alimentarios de uso umano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
g Productos o sustancias utilizados o destinados a utili arse principalmente como aditivos alimentarios de uso animal	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
ontaminantes reales o posibles del medio ambiente en general ue no figuren en otras columnas	4	12	6	0	0	0	00	0	0	0	0	2	0	224	1
i tras evaluaciones toxicol gicas o de la seguridad	66 0	0	14	6	0	0	0	6 4	0	0	0	0	0	1 20	4226
A		4 2	16	4	0	64	2116	0	16	24	6	0	2 164	1 1	

7. PLANTILLA DE LA ENCUESTA POBLACIONAL

1. Edad:

- ☐ < 18 años
- ☐ 18-30 años
- ☐ 31-40 años
- ☐ 41-50 años
- ☐ 51-60 años
- ☐ > 60 años

2. Sexo:

- ☐ Hombre
- ☐ Mujer

3. ¿En qué campo estudia/trabaja?

- ☐ Medicina veterinaria
- ☐ Medicina humana
- ☐ Otras ciencias de la salud
- ☐ Otros

4. La diabetes es una enfermedad que afecta a miles de personas y animales, y que supone un gran gasto económico (para la Seguridad Social o para el propietario de algún animal que la padezca). ¿Sabe en qué consiste la diabetes?

- ☐ Si
- ☐ No
- ☐ NS/NC

5. ¿Conoce a alguien cercano que padezca esta enfermedad?

- ☐ Si
- ☐ No
- ☐ NS/NC

6. La diabetes no sólo tiene problemas de salud directos, sino que predispone a padecer otras muchas enfermedades, por ello su control es importante. ¿Considera

que el tratamiento y seguimiento de la enfermedad causan molestias y limitan la vida del paciente?

- ☐ Sí
- ☐ No
- ☐ NS/NC

7. ¿Conoce alguien que tenga una mascota con diabetes?

- ☐ Si
- ☐ No
- ☐ NS/NC

8. Si ha contestado que sí a la pregunta anterior, ¿considera que es complicado el tratamiento y seguimiento de la diabetes en animales?

- ☐ Si
- ☐ Sí, más que en humanos
- ☐ No
- ☐ NS/NC

9. Cada año se sacrifican miles de animales que se usan en experimentación animal para la investigación de enfermedades, uso de cosméticos, mejora de la producción animal, etc. ¿Considera toda esta experimentación necesaria?

- ☐ Sí, toda es necesaria
- ☐ Sólo para la investigación de enfermedades
- ☐ Sí, para la investigación de enfermedades y mejora de la producción animalos
- ☐ Sí, para la investigación de enfermedades y productos cosmét
- ☐ No, ninguna es necesaria
- ☐ NS/NC

10. ¿Cree que los resultados de esta experimentación son aplicables en el ser humano?

- ☐ Sí
- ☐ No
- ☐ NS/NC

11. ¿Sabe que la mayoría de fármacos que existen en el mercado han sido desarrollados/testados en animales?

- ☐ Sí
- ☐ No
- ☐ NS/NC

12. Existe legislación para regular la experimentación animal. ¿Lo cree necesario?

- ☐ Si
- ☐ No
- ☐ NS/NC

13. ¿Considera necesario encontrar métodos alternativos y fiables a la experimentación animal?

- ☐ Sí
- ☐ No
- ☐ NS/NC

14. Comentarios que crea oportunos (opcional):

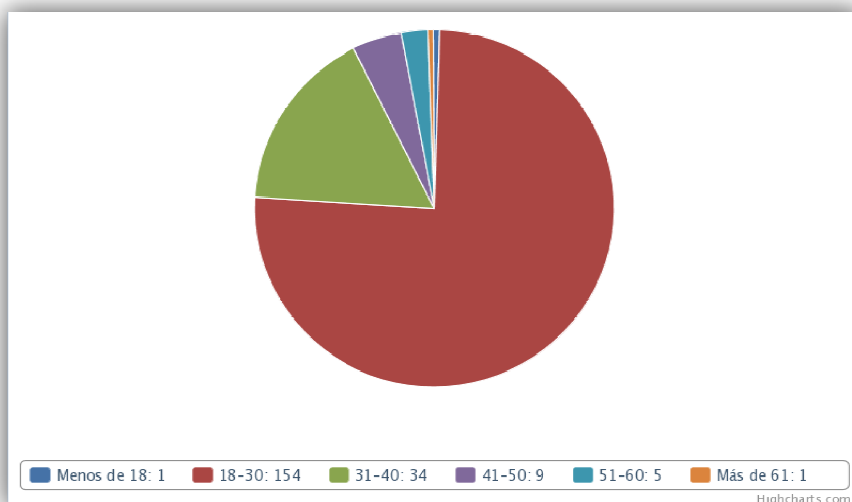
8. RESULTADOS GENERALES DE LA ENCUESTA POBLACIONAL

En este punto y el siguiente, comentaremos las respuestas de la encuesta hecha a diferentes puntos de la población. En este apartado comentamos aquellos puntos que no consideramos importantes, mientras que en el siguiente apartado, nos centramos en aquellos aspectos más relevantes a nuestro juicio.

La participación de gente en la encuesta poblacional ha sido de 204 personas. A partir de ahí, hemos colocado una serie de gráficos para representar de forma más intuitiva los diferentes resultados, y al lado de cada uno, hemos añadido una breve explicación.

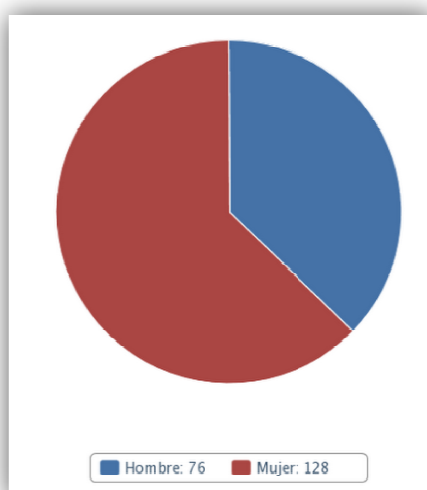
Participación total: 204 personas

1. Participación según edad:



Se observa una clara prevalencia del segmento de población de 18-30 años (75% de los participantes).

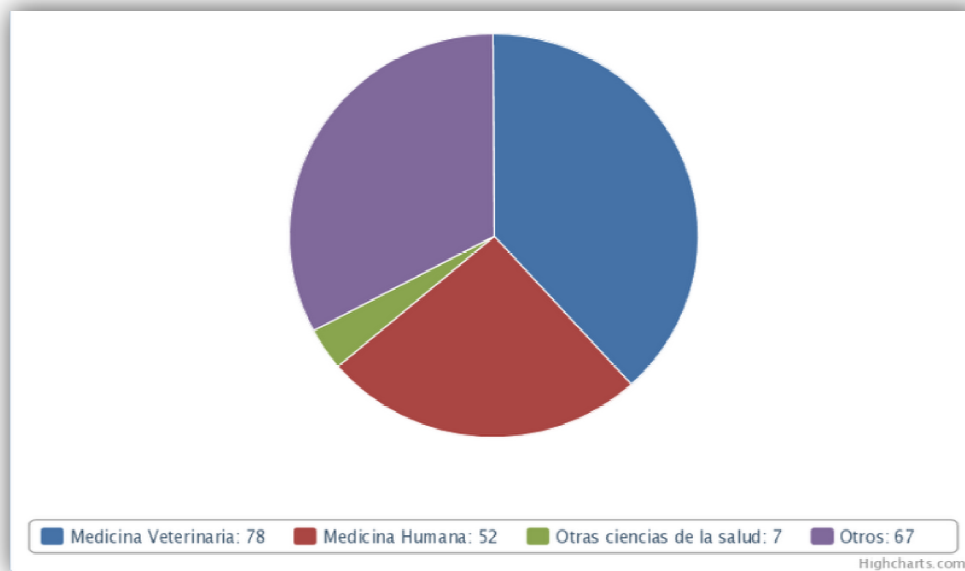
2. Participación según sexo:



El 37% de los encuestados son hombres y el 63% són mujeres.

3. Participación según campo de ocupación/estudios:

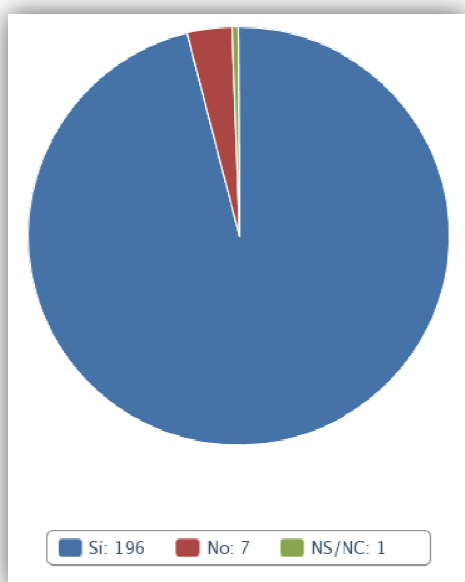
Los entrevistados relacionados con el mundo de la Medicina Veterinaria representan el 38% de los encuestados.



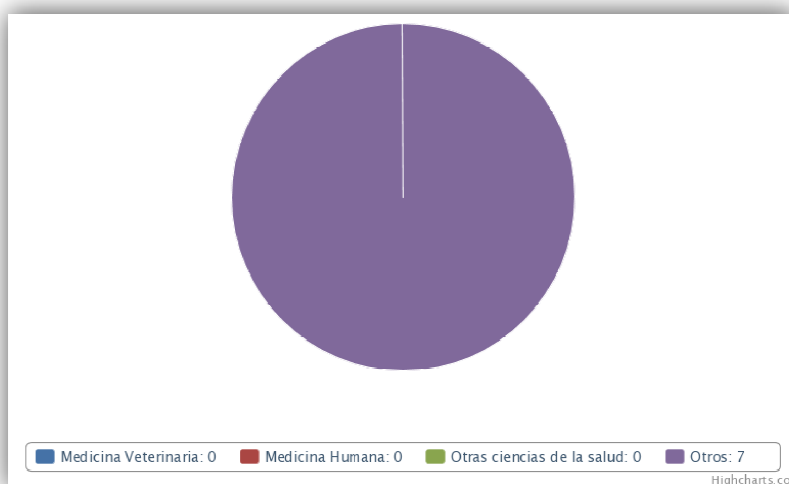
9. RESULTADOS DERIVADOS/CONCLUYENTES DE LA ENCUESTA POBLACIONAL

Como ya hemos comentado, aquí nos centraremos en comentar aquellas preguntas más interesantes o más importantes para el tema del trabajo. También las acompañamos de un gráfico y una breve explicación, siguiendo el esquema del punto anterior.

4. La diabetes es una enfermedad que afecta a miles de personas y animales, y que supone un gran gasto económico (para la Seguridad Social o para el propietario de los animales que la padecen). ¿Sabe en qué consiste la diabetes?

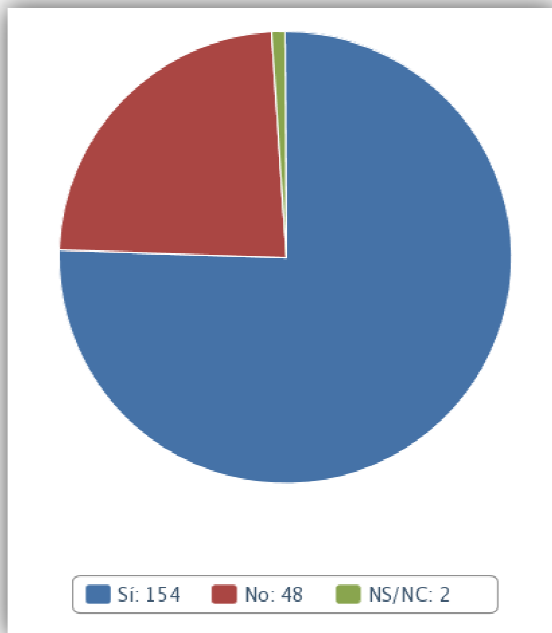


Parece haber un conocimiento generalizado de la enfermedad en la población (96% de las respuestas fueron afirmativas a este conocimiento), pues no se observan diferencias entre edades, sexos o campo de ocupación/estudios.



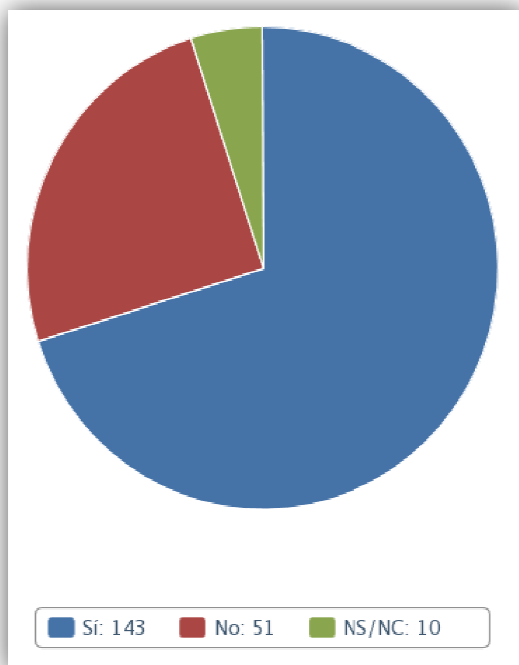
Se observa que todos los entrevistados que manifestaron que no conocían la enfermedad no tienen relación con los campos de las ciencias médicas ni de la salud.

5. ¿Conoce a alguien cercano que padezca esta enfermedad?



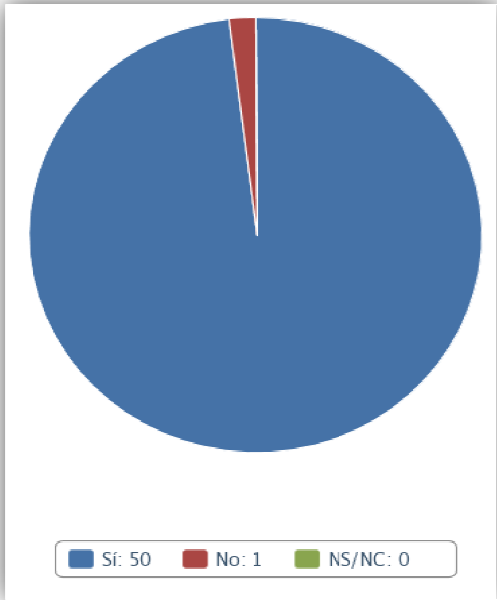
El 75% de los entrevistados manifiesta conocer a alguien cercano que padezca diabetes.

6. La diabetes no sólo conlleva problemas de salud directos sino que predispone a padecer otras muchas enfermedades, por ello su control es importante. ¿Considera que el tratamiento y seguimiento de la enfermedad causan molestias y limitan la vida del paciente?

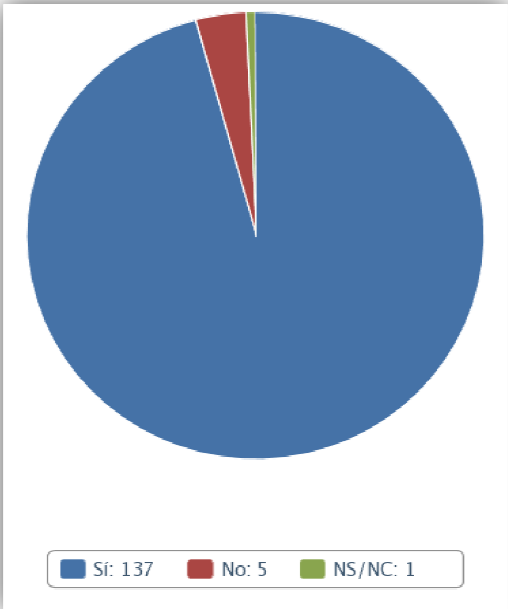


El 70% de los entrevistados considera que el tratamiento y seguimiento de esta enfermedad causan molestias y limitan la vida del paciente.

De los encuestados que respondieron negativamente, un 98% los afirmaban saber en qué consiste la diabetes:



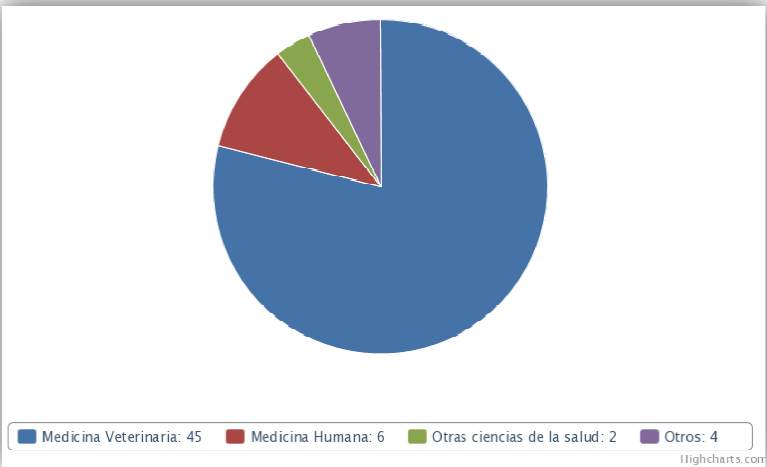
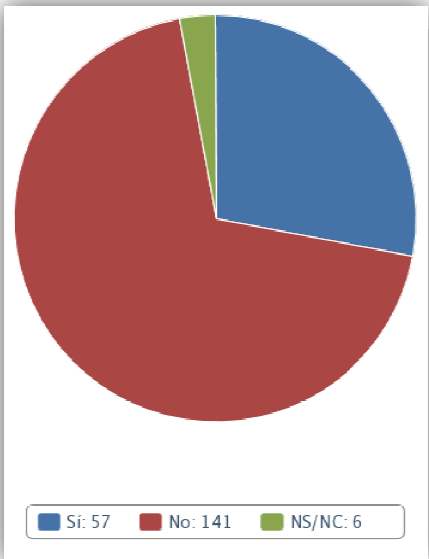
De los encuestados que respondieron afirmativamente, un 96% afirmaban conocer en qué consiste esta enfermedad:



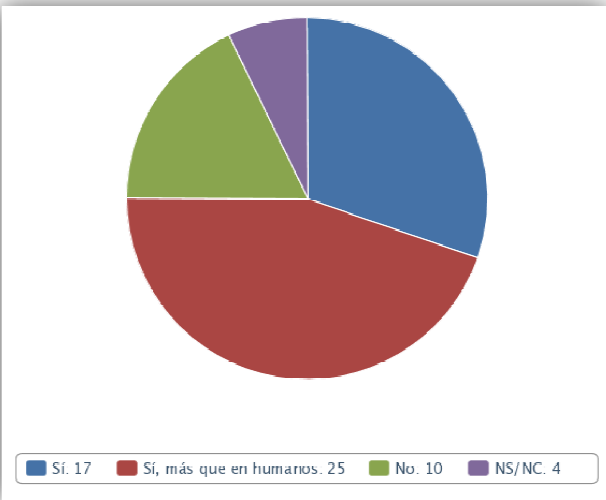
En ambos casos un 76% de los encuestados dice conocer a alguien cercano con esta enfermedad.

7. ¿Conoce a alguien que tenga una mascota con diabetes?

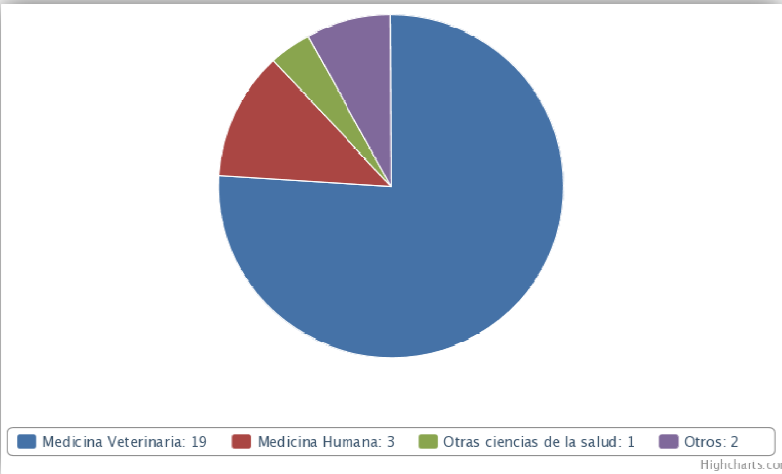
Solo el 28% de los entrevistados manifestó conocer a alguien cuya mascota sea diabética. El 79% de estas respuestas afirmativas proviene de entrevistados relacionados con la medicina veterinaria.



8. Si ha contestado que sí a la pregunta anterior, ¿considera que es complicado el tratamiento y seguimiento de la diabetes en animales?

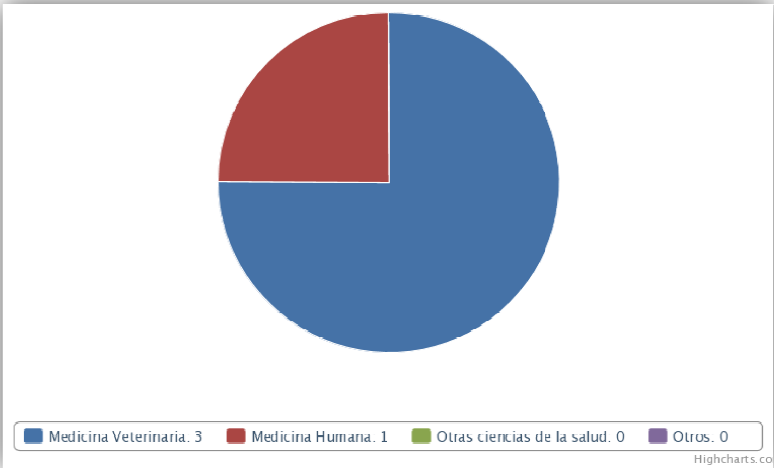


El 30% de los que respondieron a esta pregunta (los mismos que contestaron afirmativamente en la pregunta anterior) han contestado que consideran que el tratamiento y seguimiento de la diabetes en los animales es complicado, y un 45% creen que es más complicado que en humanos.



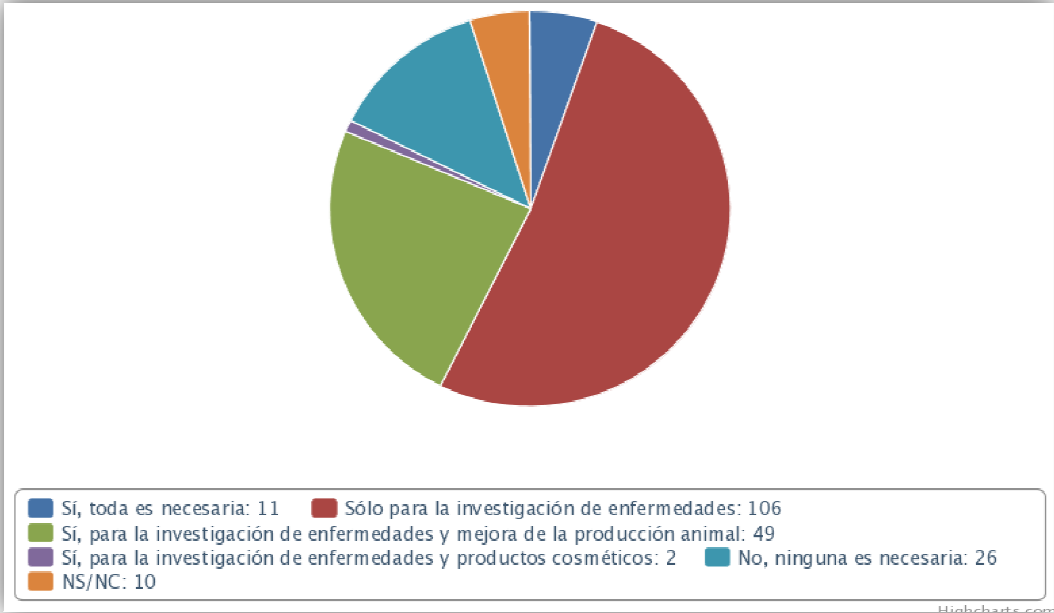
De estos últimos (el control y seguimiento en animales es más complicado que en humanos), el 76% están relacionados con la medicina veterinaria y un 12% con la medicina humana.

Es curioso que del 7% de los entrevistados que desconoce esta dificultad: el 75% está relacionado con la medicina veterinaria y el 25% restante con la medicina humana:

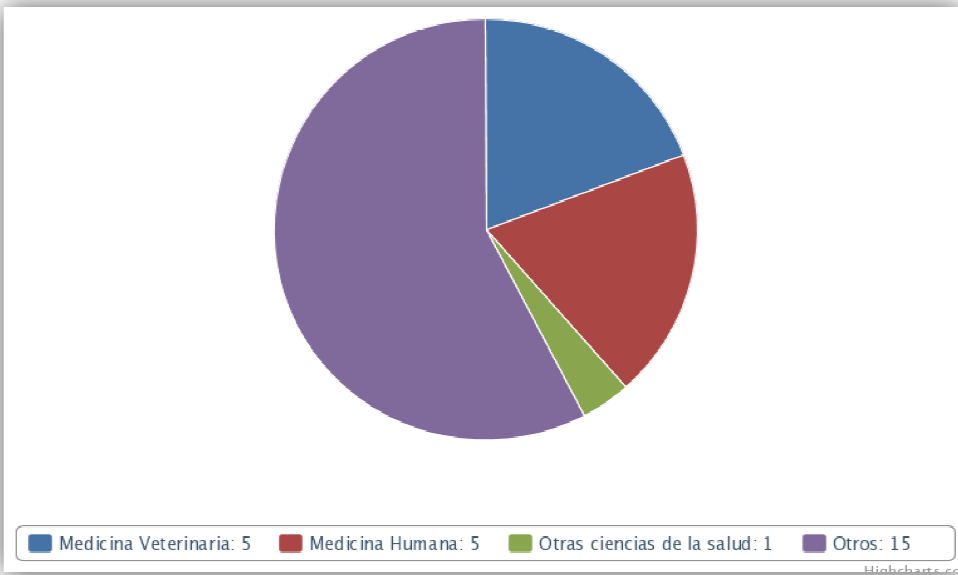


9. Cada año se sacrifican miles de animales que se usan en experimentación animal para la investigación de enfermedades (incluidos los fármacos), uso de cosméticos, mejora de la producción animal, etc. ¿Considera toda esta experimentación necesaria?

El 52% de los encuestados opina que sólo es necesaria la investigación de enfermedades:

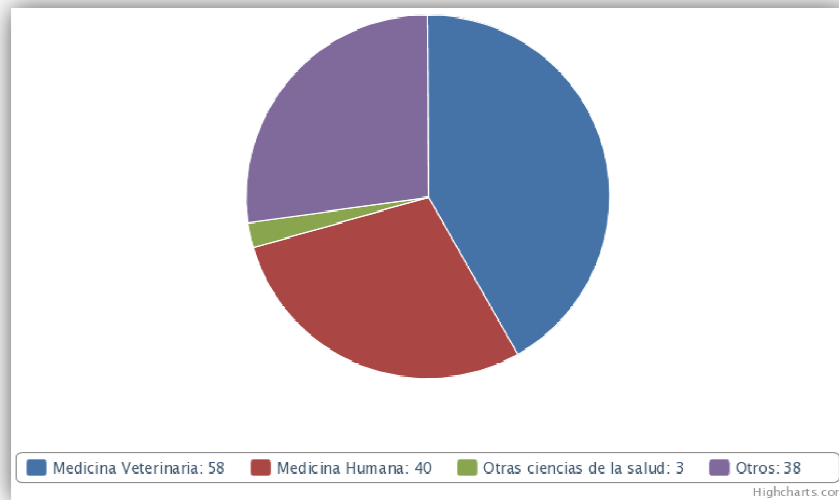


De los que consideran que ningún tipo de experimentación animal es necesario, el 58% no están relacionados con ningún campo médico ni con otras ciencias de la salud.

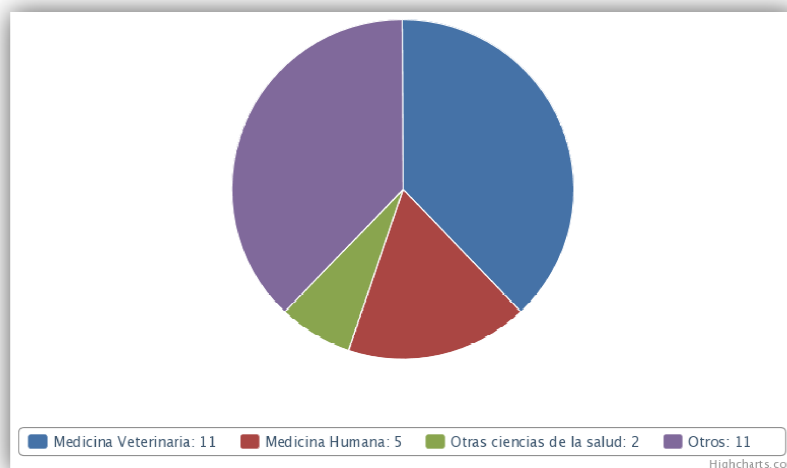


10. ¿Cree que los resultados de esta experimentación son aplicables en el ser humano?

Resultados aplicables (68%): 42% veterinaria, 29% medicina humana y 27% otros.

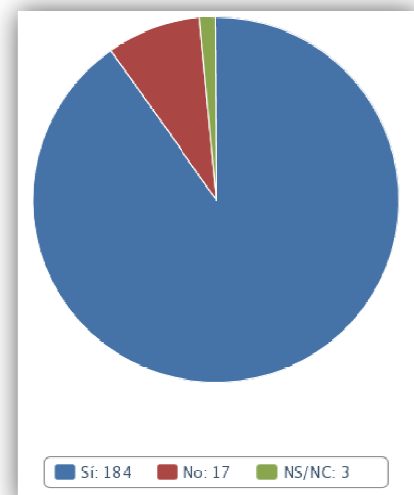


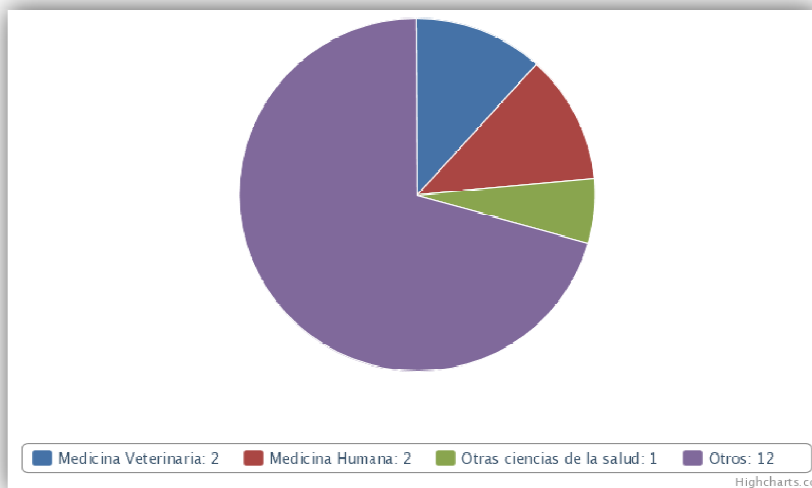
Resultados no aplicables: 38% veterinaria, 17% medicina humana y 38% otros.



11. ¿Sabe que la mayoría de fármacos que existen en el mercado han sido desarrollados/testados en animales?

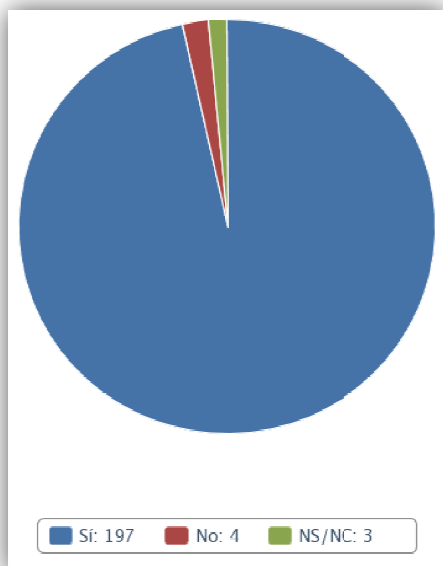
El 90% de los entrevistados dicen conocer este hecho.



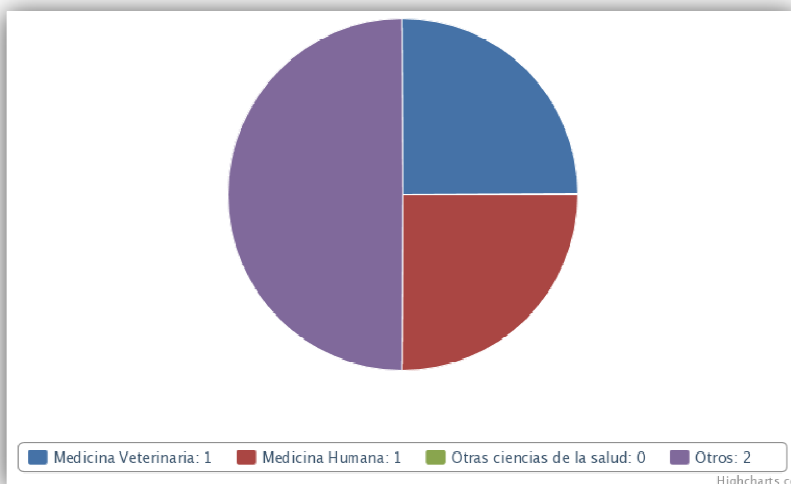


De los entrevistados que desconocían el testaje de los fármacos en animales, el 71% no está relacionado con ningún campo médico ni con ciencias de la salud.

12. Existe legislación para regular la experimentación animal. ¿Lo cree necesario?

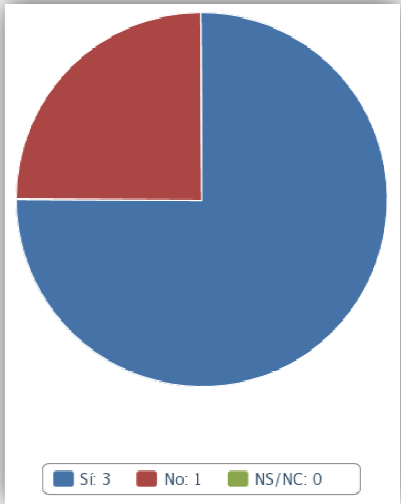


El 97% de los entrevistados cree necesaria la legislación que regula la experimentación animal.

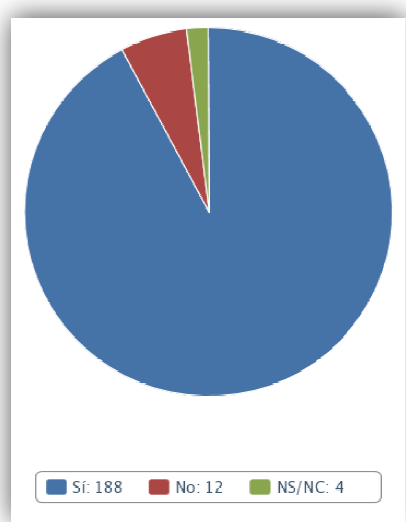


Es curioso que de los encuestados que no creen necesaria una legislación (2%): el 25% estén relacionados con la veterinaria y otro 25% con la medicina humana.

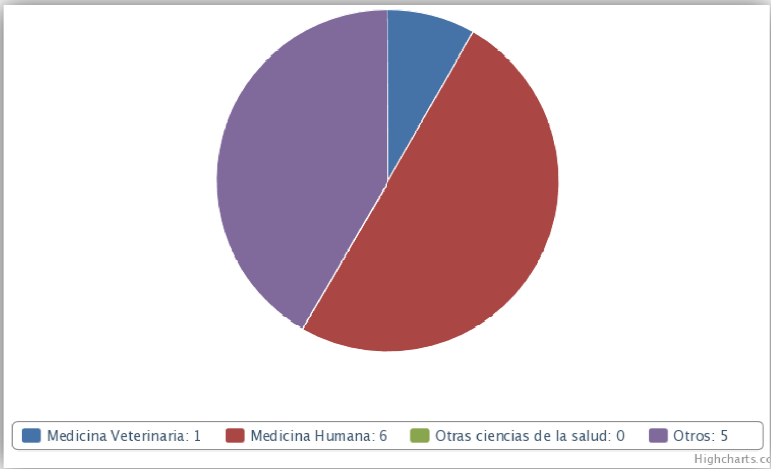
De ellos, el 75% dice conocer el testaje y desarrollo de medicamentos en animales.



13. ¿Considera necesario encontrar métodos alternativos y fiables a la experimentación animal?



El 92% de las personas encuestadas ha respondido que sí es necesario.



La mitad de los encuestados que no consideran necesario encontrar métodos alternativos y fiables están relacionados con el campo de la medicina humana y un 42% no tiene relación con los campos médicos ni de otras ciencias de la salud. El 8% está relacionado con la medicina veterinaria.

10. ENTREVISTAS PERSONALES

A continuación hemos considerado interesante realizar una serie de entrevistas para plasmar de primera mano qué opiniones tienen diversas personas relacionadas con la diabetes.

PACIENTES DIABÉTICOS

Silvia Caballero

Hola, me llamo Silvia Caballero, tengo 23 años y soy diabética.

1. Des de cuándo tienes diabetes y qué clase de diabetes.

Mi diabetes es la del tipo 1, y la padezco des de los 7 años.

2. ¿Cómo descubriste que tenías esta enfermedad?

Mis padres notaron que empecé a adelgazarme mucho y orinaba muy frecuentemente, por lo que me llevaron al pediatra. Allí, tras explicar los síntomas, el médico sólo tuvo que hacerme un control de la glucosa en sangre para saber que tenía diabetes.

3. Te has informado de en qué consiste tu enfermedad y vas leyendo los avances que se van produciendo en este campo? ¿Cuáles son?

Al debutar, me ingresaron una temporada en el hospital St. Juan de Déu de Barcelona, dónde me estabilizaron y empezaron a instruirme a mí y a mi familia en lo que consistía mi enfermedad. No sigo muy detenidamente los nuevos avances que se hacen en el campo, pero pongo atención si me llega alguna información.

4. En qué te ha limitado y en qué te limita la enfermedad? Como te ha afectado y afecta en tu vida cotidiana.

Bueno, en general, puedo llevar una vida “normal”, sin embargo, notas las pequeñas obligaciones día a día. Además de que mi enfermedad me obliga a pincharme una serie de veces al día, también debo tenerla presente para cualquier plan que haga. Si deseo hacer un viaje, por ejemplo, tengo que saber de antemano en qué consistirá para poder predecir qué material me debo llevar, y rezar para que no haya imprevistos, por lo que las decisiones espontáneas no son muy comunes en mí.

Si salgo de fiesta, debo tener un control muy cuidado del alcohol que bebo, emborracharme podría ser muy contraproducente para mí. Lo que a una persona podría producirle mareos, desinhibición, problemas de equilibrio y una resaca al día siguiente, a mí podría llevarme al hospital según como reaccionara.

Como esto, hay mil cosas más que podría poner como ejemplo.

5. A nivel económico, ¿qué efectos ha tenido en ti y en tu familia? Si no fuese por la seguridad social, ¿crees que habría mucha gente que no se podría medicarse? ¿Crees que el gasto que supone en sanidad esta enfermedad es importante?

Hay que tener muy en cuenta que la diabetes es una enfermedad que no es mortal si es tratada. Por otra parte, el importe económico que supone el material de tratamiento (dejando de lado la seguridad social) es muy alto. En otras palabras, el paciente de diabetes es un paciente caro, y una fuente de dinero importante. Es por lo que, principalmente, aunque se hagan investigaciones sobre una posible cura, no se hacen, quizás, con el “entusiasmo” suficiente, ya que no interesa —No es una enfermedad mortal. El tratamiento es caro. No hay prisa—.

Para que os hagáis una idea de el coste, os puedo decir que solo en insulina (sin contar el material restante) el importe es de unos 900€ al año. Con todo el material, se pasan perfectamente los 2.000 € anuales. Por suerte, la Seguridad Social se ha hecho cargo de una gran parte del coste, por lo que mi familia ha tenido que pagar un mínimo. Si no fuera así, seguramente muchas familias no podrían pagar el tratamiento, con consecuencias peliagudas.

6. Qué problemas crees que a largo plazo tendrás?

Bueno, un descontrol de la glucosa puede causar, a largo plazo, varios problemas en el organismo en general (vista, corazón,...). Sin embargo, los riñones son los que pueden padecer problemas antes. La explicación es sencilla: los riñones, como todos sabemos, filtran la sangre. En la sangre hay glucosa. La molécula de la glucosa es un poquitín justa para el tamaño de los “filtros”, por lo que produce desgaste. En una persona sana, la cantidad de glucosa que soportan los riñones a lo largo de su vida es aceptable; pero una persona diabética, que sufre descontrol de glucosa en sangre, a lo largo de los años puede producir un mayor desgaste a los riñones y que se originen problemas. O eso fue lo que me dijeron.

7. ¿Es una enfermedad que afecta también a los de tu alrededor? ¿Se han implicado en tu día a día?

Bueno, cualquier enfermo necesita el apoyo de las personas de su alrededor. Al debutar muy jovencita, mi familia se implicó al máximo con mi tratamiento, era una niña, pero es una enfermedad de la que puedes hacerte cargo tu mismo por tu cuenta una vez adulto, si eres un poco responsable.

Sin embargo, también es una enfermedad que te puede dejar incapacitado, como por ejemplo, por culpa de una hipoglucemia severa, dónde puedes perder el conocimiento, entre otros problemas. Ahí necesitas la ayuda de las personas de tu alrededor sí o sí, porque hay situaciones en las que no te puedes hacer cargo de ti mismo aunque quieras.

8. ¿Crees y esperas que algún día habrá una cura para tu enfermedad?

Sí, espero que algún día pueda salir una solución, sin embargo prefiero no hacerme ilusiones.

9. ¿Qué es lo que más te molesta de tu enfermedad? ¿Y cuál es tu limitación más grande?

Quizás el hecho de que tienes que tenerla en cuenta para casi todo lo que hagas. Es, digamos, aquello que ensombrece un poco tus planes. Por suerte, no es tan grave como la persona que tiene las piernas incapacitadas, o aquel que tiene que ir cada semana a hacerse una diálisis, sin embargo, tienes que estar siempre pendiente. En lo que comes, en lo que haces, a quiénes pueden afectar tus circunstancias... No es un gran sacrificio, pero hace mella.

10. Si no se encontrase una cura para la diabetes, pero sí un fármaco que mejorase su administración, ¿qué le pedirías a éste fármaco?

Buuuuuf. Buf. No sé. Supongo que fuera un poco más práctico que tener que pincharse cada dos por tres. Y que permitiera más flexibilidad en los horarios, supongo.

11. Para obtener nuevos fármacos para tu enfermedad (y para cualquier otra), una parte primordial es la experimentación animal. ¿Qué piensas de este tema?

Por una parte, no me gusta la experimentación animal, por otra, comprendo que es necesario, pero sigue sin gustarme. Sé que nadie en su sano juicio se ofrecería voluntario para hacer de cobaya, por lo que se opta por animales hasta llegar a resultados que se puedan probar con personas, pero... no sé, me parece un poco injusto, supongo. Sé que si se les pudiera preguntar a esos animales, no elegirían estar dónde están. Es un poco hipócrita, porque soy consciente de que yo y millones se han beneficiado de estas prácticas, pero causa malestar, personalmente.

Dani Fernández

Hola, me llamo Dani Fernández, tengo 23 años y soy diabético.

1. Des de cuándo tienes diabetes y qué clase de diabetes.

Tengo diabetes desde los 11 años, del tipo 1.

2. ¿Cómo descubriste que tenías esta enfermedad?

Empecé a beber y orinar mucho.

3. ¿Te has informado de en qué consiste tu enfermedad y vas leyendo los avances que se van produciendo en este campo? ¿Cuáles son?

Cada 6 meses tengo análisis y consulta con el Endocrino (es quien lleva estas enfermedades) y él mismo me informa de los avances y últimos “productos”.

4. ¿En qué te ha limitado y en qué te limita la enfermedad? Como te ha afectado y afecta en tu vida cotidiana.

Nunca me ha limitado nada físicamente, siempre tengo que llevar algo de azúcar encima. Me afecta a la hora de comer cosas con azúcar, ya que no puedo pero la mayoría de productos de alimentación ya hay sin azúcar.

5. A nivel económico, ¿qué efectos ha tenido en ti y en tu familia? Si no fuese por la seguridad social, ¿crees que habría mucha gente que no se podría medicarse? ¿Crees que el gasto que supone en sanidad esta enfermedad es importante?

Si, es bastante “cara” la insulina, y hasta el momento no me ha afectado económicamente ya que la seguridad social se hace cargo del 90% del coste de los medicamentos, en caso de que no existiera esa ayuda, supongo que habría algún seguro o algo ya que son más de 2.000 euros al año costearse la medicación (sin contar con las maquinas para el azúcar, agujas...).

6. ¿Qué problemas crees que a largo plazo tendrás?

Espero no tener ninguno ya que llevo la diabetes bastante bien, pero siempre hay algún día de excesos (por ejemplo fin de año) en los que comes azúcar quieras o no, en esos casos me pongo mas insulina y lo controlo a menudo. Me da muchísimo miedo quedarme ciego o tener problemas con las piernas, causando la amputación, debido a eso controlo mucho el azúcar.

7. ¿Es una enfermedad que afecta también a los de tu alrededor? ¿Se han implicado en tu día a día?

La gente de mi alrededor intenta evitar el azúcar para que no me entren ganas a mí, aunque la verdad no me afectaría. Yo ya sé lo que puedo comer o no.

8. ¿Crees y esperas que algún día habrá una cura para tu enfermedad?

Hay muchísimos avances, muchos famosos lo que hacen es operarse y se ponen una maquinita enganchada a las costillas, que va suministrando el azúcar automáticamente, pero yo prefiero seguir con las agujas ya que me da pánico tener una maquina enganchada a mi cuerpo.

9. ¿Qué es lo que más te molesta de tu enfermedad? ¿Y cuál es tu limitación más grande?

El tener que estar 3 veces al día sin falta de pincharme la insulina, me es lo mismo pincharme que inhalarla (en caso de que la inhalara también lo tendría que hacer 3 veces al día por lo que la molestia sería la misma).

10. Si no se encontrase una cura para la diabetes, pero sí un fármaco que mejorase su administración, ¿qué le pedirías a éste fármaco?

Creo que un diabético será diabético toda la vida, a no ser que se sustituya el páncreas (casos extremos en los que no queda otra que operar y cambiar el órgano mediante un donador fallecido).

11. Para obtener nuevos fármacos para tu enfermedad (y para cualquier otra), una parte primordial es la experimentación animal. ¿Qué piensas de este tema?

Difícil contestar ya que estoy en contra del maltrato animal, y nunca me había hecho esa pregunta la verdad, quizá sea cruel, pero si con investigación con animales me alargan la vida 10 años, o evitan que me quede ciego o con una pierna amputada, y tal como a mí a la mayoría de gente diabética (que cada vez somos más), supongo que estoy a favor.

Antoni Terré

Hola, me llamo Antoni Terré, tengo 54 años y soy diabético.

1. Des de cuándo tienes diabetes y qué clase de diabetes.

Tengo diabetes desde los cuarenta años, aproximadamente. Al principio tenía diabetes leve y ahora ya estoy con el tratamiento de insulina. Tengo diabetes tipo 2.

2. ¿Cómo descubriste que tenías esta enfermedad?

Empecé a adelgazar sin motivo aparente y sobretodo notaba que tenía mucha sed y bebía muchísima agua durante el día. Fui al médico y, al hacerme la “prueba del dedo”, enseguida me dio el diagnóstico.

3. ¿Te has informado de en qué consiste tu enfermedad y vas leyendo los avances que se van produciendo en este campo? ¿Cuáles son?

No, toda la información que tengo es por boca del médico cuando voy a consulta, ya sea para una revisión, a buscar resultados, etc. Creo que lo que tengo que saber ya me lo informa la doctora cuando es necesario que lo sepa, y nunca he tenido la curiosidad de saber más allá de esto.

4. ¿En qué te ha limitado y en qué te limita la enfermedad? Como te ha afectado y afecta en tu vida cotidiana.

El límite con el que me encuentro cada día es la “prohibición” de comer dulces, cosa que me gusta mucho. A parte de este detalle poco significativo, del modo que más me ha afectado es en que en esta enfermedad se debe controlar el horario y la comida de forma bastante estricta, y es en casa cuando se lleva mejor control. En mi caso, por el trabajo que tengo –conduzco un camión-, me cuesta mucho seguir esta norma (y con la insulina aún más difícil) y a veces me es imposible hacer todas las comidas en casa.

5. A nivel económico, ¿qué efectos ha tenido en ti y en tu familia? Si no fuese por la seguridad social, ¿crees que habría mucha gente que no se podría medicarse? ¿Crees que el gasto que supone en sanidad esta enfermedad es importante?

En mi caso la medicación me la cubre casi toda la Seguridad Social, yo tengo que aportar una cantidad pequeña, así que el tema económico no ha sido muy influyente mi enfermedad.

En el caso que me hubiera tenido que pagar siempre el total de la medicación creo que habría repercutido y mucho en mi economía, ya que la tanto la insulina, las tiras para recoger sangre y demás material que es básico para el enfermo es realmente caro. Con eso quiero decir que los enfermos de diabetes creo que somos un gasto importante en Sanidad, tanto en la diabetes mismo como en las enfermedades que van asociadas (por ejemplo enfermedades visuales, de riñón, ect) que deben ser muy controladas. En mi caso la medicación me la cubre casi toda la Seguridad Social, yo tengo que aportar una cantidad pequeña, así que el tema económico no ha sido muy influyente mi enfermedad.

En el caso que me hubiera tenido que pagar siempre el total de la medicación creo que habría repercutido y mucho en mi economía, ya que la tanto la insulina, las tiras para recoger sangre y demás material que es básico para el enfermo es realmente caro. Con eso quiero decir que los enfermos de diabetes creo que somos un gasto importante en Sanidad, tanto en la diabetes mismo como en las enfermedades que van asociadas (por ejemplo enfermedades visuales, de riñón, ect) que deben ser muy controladas.

6. ¿Qué problemas crees que a largo plazo tendrás?

No sé exactamente los problemas que puedo tener, sé lo que debo ir controlando estrictamente porque si no, podría empeorar: la salud visual, riñones, circulación sanguínea, vigilar mucho con heridas que quizá para otra persona serían insignificantes, etc.

7. ¿Es una enfermedad que afecta también a los de tu alrededor? ¿Se han implicado en tu día a día?

En mi caso tengo la enfermedad bien controlada y puedo hacer vida totalmente normal. Cuando se me diagnosticó la enfermedad mi familia se implicó mucho porque vino muy de sorpresa pero hoy por hoy tengo la suerte de no afectar en casi nada a mi alrededor en lo que la enfermedad se refiere.

8. ¿Crees y esperas que algún día habrá una cura para tu enfermedad?

Creo que es muy difícil que algún día haya una cura total para esta enfermedad. A lo mejor a muy largo plazo, pero yo creo que estaré siempre en tratamiento con insulina.

9. ¿Qué es lo que más te molesta de tu enfermedad? ¿Y cuál es tu limitación más grande?

El hecho de no poder comer siempre lo que me apetece y estar teniendo que controlar siempre los niveles de glucosa, es decir, el hecho de pincharme. Como limitación, quizás el hecho de tener que estar pendiente de seguir el horario de comida establecido.

10. Si no se encontrase una cura para la diabetes, pero sí un fármaco que mejorase su administración, ¿qué le pedirías a éste fármaco?

Que diera al paciente "calidad de vida", es decir, que la enfermedad lo condicionara y limitara lo menos posible en su día a día y pudiese hacer vida normal. Y que las enfermedades colaterales que conlleva la diabetes fueran lo más leves posibles.

11. Para obtener nuevos fármacos para tu enfermedad (y para cualquier otra), una parte primordial es la experimentación animal. ¿Qué piensas de este tema?

En un principio no me gusta la idea de experimentar con animales por ninguna razón, pero si se tienen que probar fármacos creo que debe hacerse antes con animales que puedan tener muchas características igual que los humanos que con las personas mismas, teniendo un respeto absoluto por los animales y intentando siempre que con eso se les haga el menor daño posible.

TRABAJADORES DEL CAMPO DE LA INVESTIGACIÓN

Cristina Llecha

Me llamo Cristina Llecha Jofre, tengo 23 años y estoy terminando la licenciatura de Veterinaria. Trabajo para el departamento de Bioquímica clínica que forma parte del CBATEG de la UAB, en concreto en la perrera de investigación con perros de raza Beagle.

1. ¿En qué consiste tu trabajo? Explica todos aquellos detalles interesantes y necesarios.

Somos un equipo de biólogos y veterinarios que estamos trabajando sobre un estudio en terapia génica para perros diabéticos. No puedo concretar más debido a la confidencialidad del trabajo, pero yo me dedico al cuidado de los perros junto a otras dos personas más. En nuestro caso, llevamos a los perros al veterinario, les hacemos las curas, llevamos el control de su peso y les damos el pienso óptimo para cada uno de ellos, adecuado a su peso y a su condición (ya que la mayoría son diabéticos), los bañamos, llevamos su control antiparasitario y por supuesto controlamos a diario sus glucemias, para poder así dar a cada uno su dosis de insulina (que ya ha sido estudiada para cada uno mediante curvas de glucosa y mediciones de fructosamina). Regularmente, también les hacemos analíticas sanguíneas para controlar su estado de salud. Los sacamos a un patio exterior todos los días dos veces al día durante una hora o a incluso a veces más tiempo.

2. ¿Qué es lo que más te gusta o te llena de tu trabajo? ¿Y lo que menos? ¿Hay algún aspecto de tu trabajo que entre en conflicto con tus valores éticos?

Lo que más me gusta es ver que a pesar de ser animales que viven en jaulas junto a otros compañeros, las personas que los cuidan son muy buenas con ellos. Emociona bastante ver que siempre se alegran de verte y saltan de alegría moviendo la cola. Tener al cargo a un total de catorce perros es una cosa que llena de por sí, ya que siempre te alegras de verlos. Todos tienen un carácter muy bueno, por lo que nunca se les aplica ningún tipo de castigo (más bien todo lo contrario).

Eso sí, no dejan de ser perros de experimentación que nunca han estado en un hogar, y eso es algo que me produce bastante pena. Sin embargo también pienso que pueden estar ayudando en la investigación de una posible cura contra la diabetes en un futuro en seres humanos. Este conflicto, que se da en múltiples disciplinas en las distintas áreas de investigación con animales, se intenta llevar de la mejor manera posible, como lo intentamos hacer nosotros en la perrera de investigación tratando lo mejor posible a los perros mientras están a nuestro cargo.

3. ¿Cambiarías algunas cosas de tu trabajo en relación a las pruebas, experimentos, tratamiento, etc. que se dan a los animales?

La verdad es que siempre que podemos hacemos las pruebas menos invasivas posible y si pueden substituirse por otras pruebas, las substituímos por otras. Los perros están muy

acostumbrados a que les inyectemos insulina y de hecho la necesitan para vivir. En nuestro caso pienso que las pruebas son adecuadas.

4. ¿Cuáles son los puntos más complicados y dolorosos/estresantes para un animal diabético?

Como he mencionado en el apartado anterior, los perros no se estresan en ningún momento porque es un proceso diario al que están acostumbrados. Sí que es verdad que puntualmente reciben tratamientos aparte (como cualquier otro perro que pudiera coger una infección de oído, por ejemplo) que sí que pueden ponerse más nerviosos a la hora de ponerles gotas en el oído o pomadas en algún punto donde lo necesiten, pero no más que cualquier otro perro que viva en casa y necesite de estos cuidados.

A pesar de este punto positivo, para poder iniciar el proceso de investigación, necesitamos obtener animales diabéticos. En este caso, se les aplica una medicación que destruye las células beta pancreáticas en el Hospital Clínico Veterinario, donde quedan ingresados el tiempo que sea necesario. Este es un punto crítico que a pesar de que la mayoría de veces da resultado sin que los perros sufran dolor alguno, por desgracia pueden reaccionar mal a la medicación y producirse una pancreatitis. En este caso quedan en manos del hospital y aunque allí hacen todo lo posible por ellos, algún caso ha terminado con la muerte del animal debido a complicaciones derivadas de esta pancreatitis.

5. ¿Crees que algún día se encontrará una cura o como mínimo, se mejorará la calidad de vida de los pacientes diabéticos a un nivel muy elevado? (humanos y animales)

Esta es una cuestión complicada, ya que hasta que no finalicen todos los estudios no se podrá saber. Sí es cierto que este experimento en concreto ya se ha publicado para ratones con un resultado bastante bueno y creo que podría ser una esperanza próxima para perros diabéticos insulino dependientes. Sin embargo, en mi opinión la terapia génica en humanos, aunque se demuestre que tenga buenos resultados, está muy lejos de ser aplicada de forma normal en la sociedad, ya que no se sabe demasiado acerca de sus riesgos a medio y largo plazo. Se entiende que se pueden hacer estudios en ratones y que de resultado, pero su esperanza de vida (mucho más corta que la de los humanos) no permite saber si tendría otros efectos indeseados en humanos pasados los años.

6. ¿Qué piensas sobre la experimentación animal? ¿Crees que toda es necesaria o por el contrario algunas son prescindibles? (experimentación animal en medicina, en cosméticos, en producción animal, en mejora animal, etc.)

Creo que necesitamos saber cómo funciona un determinado medicamento o producto en una pequeña parte de la población antes de aplicarlo y poder venderlo de forma masiva entre los seres humanos. Este hecho lleva irremediablemente a experimentar con pequeños animales (y más tarde con un grupo reducido de seres humanos). De todas formas, creo recordar que hay un comité ético que vela por estos animales y sobre los estudios que se llevan a cabo con ellos. De esta manera aseguramos que se lleven a cabo solamente estudios controlados y que no tengan otra alternativa de experimentación (células madre, bacterias, cultivos de tejidos...) aparte del estudio con animales.

Así pues, si no hubiera más remedio que hacer un estudio controlado con animales para un fin médico o de mejora (que al final beneficiaría también a esa especie en concreto porque se estaría haciendo el estudio directamente sobre ellos y se aprendería algo más acerca de su fisiología y funcionamiento) sí que lo aceptaría. Sin embargo, estoy totalmente en contra de la experimentación animal con fines propiamente superficiales como serían los productos cosméticos.

**7. ¿Crees necesarios métodos alternativos para la investigación de medicamentos?
¿Crees que son fiables o es necesaria al final la etapa de prueba en animales?**

Enlazando un poco con la pregunta anterior, en mi opinión estos estudios ya existen y creo que deberían seguir existiendo y mejorarse para, sino erradicar por completo el estudio con animales (incluidos seres humanos), al menos minimizar al máximo posible el uso de animales para la experimentación. Las alternativas son muy necesarias precisamente porque evitan en cierta medida que en ese estudio concreto se estén usando animales.

Sobre el hecho de si son fiables o no, creo que dependería un poco del estudio sobre el que se apliquen, pero quizá sí que seguiríamos necesitando de animales, aunque sea un pequeño grupo para saber cómo reaccionan. Sería más bien para minimizar al máximo posible el tener que trabajar con animales.

8. ¿Crees que es necesaria una legislación acerca de la experimentación animal? ¿Por qué?

Por supuesto, ya que debe haber unas pautas y controles para que no haya ningún tipo de infracción por parte de las empresas que realizan los estudios. Se debe regular y establecer el porqué de la necesidad de trabajar con animales en ese estudio concreto y además describir la razón por la cual no existen alternativas para su uso. Por desgracia si no estuviera regulado podría haber personas que experimentaran con ellos sin control ni fin alguno, simplemente para ver la reacción que tienen los animales frente a un estímulo concreto como pasó en siglos pasados cuando no estaba regulado.

Claudia Jambrina

Me llamo Claudia Jambrina y tengo 23 años. Estoy haciendo prácticas en el campo de la experimentación animal.

1. ¿En qué consiste tu trabajo? Explica todos aquellos detalles interesantes y necesarios.

Estoy haciendo las prácticas del máster en el grupo de tejido adiposo del CBATEG. El trabajo del grupo consiste en buscar soluciones a la obesidad con terapia génica.

2. ¿Qué es lo que más te gusta o te llena de tu trabajo? ¿Y lo que menos? ¿Hay algún aspecto de tu trabajo que entre en conflicto con tus valores éticos?

Lo que más me gusta es que me plantea problemas a los que me gusta buscar solución, siento que el trabajo es útil y el ambiente de trabajo es muy bueno. Lo que menos me gusta es que

actualmente vivo un poco lejos del lugar de trabajo y pierdo algo de tiempo en ir y venir. Creo que los experimentos con animales (que se hacen después de los pertinentes experimentos in vitro) son la única forma de obtener unos resultados que serán muy útiles y beneficiosos para la salud humana y también animal, minimizan al máximo el sufrimiento y siguen los protocolos establecidos, por ello no encuentro ningún conflicto con mis valores morales. El grupo en el que estoy trabaja con ratones, no con perros.

3. ¿Cambiarías algunas cosas de tu trabajo en relación a las pruebas, experimentos, tratamiento, etc. que se dan a los animales?

No.

4. ¿Cuáles son los puntos más complicados y dolorosos/estresantes para un animal diabético?

Lo desconozco, yo no puedo tratar con animales de experimentación vivos ya que aún no he hecho el curso: Curs en Formació per a Personal Investigador Usuari d'Animals per a Experimentació i Altres Finalitats Científiques, de la UAB.

5. ¿Crees que algún día se encontrará una cura o como mínimo, se mejorará la calidad de vida de los pacientes diabéticos a un nivel muy elevado? (humanos y animales)

Desde luego, para eso se trabaja. Se trata de una enfermedad muy extendida, con una marcada tendencia al aumento y un mejor control y tratamiento de la enfermedad beneficiará a muchísimas personas y animales, así como a la comodidad de los propietarios. Hay muchos grupos y muchas líneas de investigación dedicados a esta enfermedad y los esfuerzos por curarla o controlarla son muy grandes, se dará con un mejor tratamiento que el actual que conllevará una mayor calidad de vida.

6. ¿Qué piensas sobre la experimentación animal? ¿Crees que toda es necesaria o por el contrario algunas son prescindibles? (experimentación animal en medicina, en cosméticos, en producción animal, en mejora animal, etc.)

Creo que sí se cumplen los requisitos de que: 1 hay que evitar todo el sufrimiento animal posible, 2 aplicarlo solo al mínimo imprescindible de animales y 3 cuando no haya otra forma de obtener una aproximación; y si es para investigación en medicina y en producción o mejora animal que permitan mejorar las condiciones de vida de los animales de renta (alimentación para evitar acidosis...) o aumentar los niveles de producción respetando las normas existentes de bienestar animal.

7. ¿Crees necesarios métodos alternativos para la investigación de medicamentos? ¿Crees que son fiables o es necesaria al final la etapa de prueba en animales?

Sí, creo que es necesario probarlo primero con animales. No estaría dispuesta a probar yo un medicamento que solo se ha testado in vitro, del que no se conocen la farmacodinámica ni la farmacocinética y que por tanto podría serme muy perjudicial. Así, igual que no lo probaría yo, tampoco me parece justo que otras personas lo hiciesen por mí. Y me parece necesaria la existencia de fármacos.

8. ¿Crees que es necesaria una legislación acerca de la experimentación animal? ¿Por qué?

Sí, para asegurar el bienestar animal.

PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA

Vanesa Domènech

Vanesa Domènech Martínez, Facultativo Especialista en Medicina de Familia y Comunitaria y Médico Adjunto de Urgencias y Emergencias. Actualmente trabajo en el Centro de Atención Primaria en el CAP Sant Pere y en la Residencia Roger de Llúria y en el Servicio de Urgencias del Hospital Provincial Joan XXIII.

1. Como médico, ves cantidades de enfermedades diferentes en el día a día. La diabetes, ¿qué papel juega en tu trabajo? (me refiero si crees que es una enfermedad común o no en tu hospital, si te da muchos problemas en el diagnóstico, etc.)

La DM sobretodo la DM tipo 2 es una de las enfermedades crónicas más prevalentes dentro del ámbito de Atención primaria. También debo mencionar que la DM 2 es una enfermedad estrictamente relacionada con la obesidad, sobre todo con el perímetro abdominal y por lo tanto evitable. Es mucho más económico trabajar en prevención primaria que tratar la DM o una de sus múltiples complicaciones.

2. ¿Cuáles son los problemas más importantes en un paciente diabético? (me refiero a nivel económico, a nivel de limitación de la vida del paciente en el día a día, enfermedades secundarias asociadas...)

La DM es una enfermedad metabólica en que es crucial un control en HC de la dieta , es primordial y por tanto limita la vida social del paciente, eso sin mencionar los controles de los niveles de glicemia y la toma de fármacos o insulina para el buen control . Des del punto de vista económico , el tratamiento de la DM es muy costoso , las tiras reactiva y los glucómetros tienen un precio elevado al igual que la insulina o hipoglucemiantes orales en contrapartida su prevención no ocasiona un gasto económico tan elevado, eso sin mencionar los controles analíticos rutinarios , y las pruebas complementarias para diagnosticar complicaciones secundarias como retinopatía diabética (retinografía con cámara amidriática) , nefropatía diabética, neuropatía diabética , todas ellas irreversibles .

3. ¿Crees que algún día se encontrará una cura o como mínimo, se mejorará la calidad de vida de los pacientes diabéticos a un nivel muy elevado?

Es posible, pero insisto, debemos trabajar en prevención primaria, es mucho más económico , pero quizás para la industria farmacéutica es mucho menos rentable

- 4. En relación a la pregunta anterior, la obtención de la gran mayoría de fármacos se consigue gracias a la experimentación animal. ¿Qué piensas sobre la experimentación animal? ¿Crees que toda es necesaria o por el contrario algunas son prescindibles? (experimentación animal en medicina, en cosméticos, en producción animal, en mejora animal, etc.)**

Es evidente que como médico puedo apoyar la experimentación animal para realizar estudios sobre tratamientos o vacunas, pero también es importante mencionar que muchas veces los resultados no son extrapolables a los seres humanos y por tanto evitables. No apoyo en absoluto experimentación animal en cosméticos y en otros campos.

- 5. ¿Conoces a alguien que esté investigando en el campo de la diabetes?**

Sí, al Dr. Bernardo Costa, un médico investigador que tiene una Beca Europea para la investigación en el tratamiento y sobre todo en la prevención de la diabetes mellitus tipo 2. Estudia en seres humanos aquellos aspectos clave en la prevención de la enfermedad, pues es bien sabido que prevenir la diabetes (la tipo 2, que es adquirida) es la opción más económica y factible, tanto para el paciente como para la sociedad en general. Un paciente que es diabético, hoy en día, morirá siéndolo, pues no hay cura. Es un enfermo crónico que tendrá mil y una complicaciones, que cada vez empeorarán más su calidad de vida y le supondrán un mayor coste.

- 6. ¿Crees necesarios métodos alternativos para la investigación de medicamentos? ¿Crees que son suficientemente fiables o es necesaria la etapa de prueba en animales?**

Sí, por supuesto que los creo necesarios y no veo indispensable la etapa de experimentación con animales si se ensaya con fármacos suficientemente seguros.

- 7. ¿Crees que es necesaria una legislación acerca de la experimentación animal? ¿Por qué?**

Sí que hace falta una legislación que regule la experimentación animal, no se puede permitir que se practique ensayos de forma indiscriminada y sin una buena base científica así como no me parece bien que determinadas carreras hagan prácticas quirúrgicas con animales vivos (ratas de laboratorio) y me refiero a la carrera de medicina, hay otras formas de aprender técnicas quirúrgicas.

PROFESIONALES DE LA MEDICINA VETERINARIA

Rafa Ruiz de Gopegui

Me llamo Rafa Ruiz de Gopegui, y soy Licenciado y Doctor en veterinaria i Diplomado ECVIM-CA en Medicina Interna. Llevo ejerciendo 26 años.

1. Como veterinario en activo, has tenido contacto con miles de pacientes diferentes con enfermedades muy variadas. Dentro de este amplio abanico, ¿qué importancia le das a una enfermedad como la diabetes?

Es en lo que más trabajo, una enfermedad que conozco bien. Veo bastantes casos de diabetes canina y felina, tanto como primera consulta como referidos. También he publicado algunas cosas sobre el tema, he dado cursos, etc., así que es un tema del cual tengo mucho interés por todo lo que me implica.

2. ¿Qué problemas más importantes causa en el paciente? ¿Y el en propietario? ¿Es una enfermedad cara de tratar en animales?

Es una enfermedad de diagnóstico relativamente sencillo, pero la dificultad reside en conocer y tratar las complicaciones y las enfermedades recurrentes. Esa es la dificultad desde el punto de vista técnico. Después es complicado el tratamiento y el control.

El coste puede ser alto sobre todo en diabetes complicada, especialmente en animales cetoadicóticos, ya que tienen un riesgo de mortalidad alto y requieren un tratamiento intensivo que es muy caro. Si sumas el control del tratamiento (recordemos que es una enfermedad crónica) y el propio tratamiento, hacen que sea muy cara para el propietario.

3. ¿El tratamiento es eficaz en medicina veterinaria? ¿Qué diferencias o deficiencias más notables hay respecto al tratamiento en personas?

Hay algunas diferencias entre los dos tratamientos: en veterinaria se hacen menos controles de glucemia (no se hacen controles diarios) y se da una dosificación bastante estándar y no se combinan insulinas ni se hacen dosificaciones diferentes según la hora del día. La segunda diferencia es que en el ser humano es una enfermedad que tiene muchas complicaciones, en cambio, en animales no hay tantas. Mantenemos el control de la glucemia de una manera un poco menos estricta como se mantiene en humanos. Los mantenemos un poco hiperglucémicos porque el riesgo de la hipoglucemia es demasiado grave y no nos lo podemos permitir. También hay diferencias de manejo, de manera que algunos controles de curvas de glucemia en animales no se pueden hacer, por lo que hay que buscar otras técnicas.

4. Para la obtención de medicamentos efectivos y seguros, es indispensable la experimentación de éstos en animales, así como la inducción de enfermedades para tener modelos para estudiar ¿Qué opinión tienes sobre la experimentación animal? ¿Crees que toda es necesaria o por el contrario algunas son prescindibles? (experimentación animal en medicina, en cosméticos, en producción animal, en mejora animal, etc.)

No me gusta, pero no conozco alguna solución o algo alterantivo, seguro y eficaz para poder usar métodos alternativos.

La experimentación animal abarca un campo amplio, no sólo investigación de enfermedades y de medicamentos. Por ejemplo, para la detección y diagnóstico de enfermedades como el sida, se necesitan anticuerpos, y estos, sólo se pueden producir mediante animales de experimentación animal (hasta la fecha). Por ejemplo, se cogen conejos, que se crían y

mediante unos procesos, se obtiene de ellos anticuerpos monoclonales. Desconozco si existe alguna forma de producir anticuerpos monoclonales que no implique animales de experimentación. Este es el presente de la medicina desde hace algunos años.

5. ¿Crees que algún día se encontrará una cura o como mínimo, se mejorará la calidad de vida de los pacientes diabéticos a un nivel muy elevado?

Estoy convencido de que sí y que a no mucho tardar, entre 10-20 años se revolucionará el tratamiento de la diabetes. Hay mucho trabajo que se está realizando en todo este tipo de enfermedades, me refiero a enfermedades que cursan con el déficit o ausencia de una enzima o una hormona. Hay mucho trabajo realizándose en volver a crear la posibilidad de que un organismo vuelva a secretar una sustancia de la cual es deficitaria. Espero que sí.

La terapia génica si se realiza bien dará resultados y si el camino que lleva es erróneo llegaremos a un callejón sin salida, pero prefiero creer que se llegaran a obtener resultados.

Además es una enfermedad que implica tantas complicaciones... Todo lo que sea amortiguar las complicaciones, es un avance muy importante y todo lo que suponga mejorar la calidad de vida del paciente, supone una mejora para el mismo y para la gente de su alrededor. Además, a nivel económico, si tú consigues un tratamiento que abarata el coste de la enfermedad, hace que tengas más dinero para gastar en otras enfermedades y eso siempre es bueno.

6. ¿Crees necesarios métodos alternativos para la investigación de medicamentos? ¿Crees que son fiables o es necesaria al final la etapa de prueba en animales?

Creo que no hay métodos alternativos para la investigación de medicamentos y enfermedades que sean efectivos, es una etapa necesaria, que no se puede eliminar. Lo único que se puede es hacer la experimentación animal lo más eficaz posible. Ello se consigue gracias a los avances que hay actualmente en métodos estadísticos y en tecnología, que intentan hacer la experimentación animal lo más precisa posible; es decir, conseguir métodos que nos garanticen que el número de animales a escoger nos dará resultados válidos, y que no nos estaremos quedando cortos ni pasándonos.

A mi parecer, con el conocimiento actual y con las bases científicas y tecnológicas actuales, es lo máximo que se puede hacer, no hay un modelo alternativo útil, seguro, eficaz y sobre todo, viable.

7. ¿Crees que es necesaria una legislación acerca de la experimentación animal? ¿Por qué?

Yo creo que la legislación que hay ha estado influida (y hecha) en parte por gente que no tenía los conocimientos necesarios para hacerla. No hay una legislación perfecta, y esta no es menos. Hay errores que habría que solucionar, como en todas.

David Quiñones

Me llamo David Quiñones Vázquez, soy Licenciado en Veterinaria, tengo 33 años y trabajo en clínica de pequeños animales desde hace 10 años.

1. **Como veterinario en activo, has tenido contacto con miles de pacientes diferentes con enfermedades muy variadas. Dentro de este amplio abanico, ¿qué importancia le das a una enfermedad como la diabetes?**

No es una enfermedad muy frecuente. No es difícil diagnosticarla en perros, sí en gatos que a veces dan falsos positivos por el estrés.

2. **¿Qué problemas más importantes causa en el paciente? ¿Y el en propietario? ¿Es una enfermedad cara de tratar en animales?**

Es cara, la mayoría de propietarios ponen trabas por la dificultad de pinchar al animal y la dificultad de ajustar las dosis, así como por el coste.

3. **¿El tratamiento es eficaz en medicina veterinaria? ¿Qué diferencias o deficiencias más notables hay respecto al tratamiento en personas?**

Es eficaz pero cuesta mucho encontrar la dosis efectiva. La diferencia más grande con respecto a humana es que no se puede controlar tan frecuentemente la glucemia y los animales no siempre comen a horas exactas.

4. **Para la obtención de medicamentos efectivos y seguros, es indispensable la experimentación de éstos en animales, así como la inducción de enfermedades para tener modelos para estudiar ¿Qué opinión tienes sobre la experimentación animal? ¿Crees que toda es necesaria o por el contrario algunas son prescindibles? (experimentación animal en medicina, en cosméticos, en producción animal, en mejora animal, etc.)**

Creo que a estas alturas de siglo XXI la experimentación en animales no es necesaria. Hay otros modelos para poder hacerla aunque resulte más cara.

5. **¿Crees que algún día se encontrará una cura o como mínimo, se mejorará la calidad de vida de los pacientes diabéticos a un nivel muy elevado?**

Supongo que en unos años en cuanto haya más casos se investigará más. Una insulina oral sería muy efectiva y práctica.

6. **¿Crees necesarios métodos alternativos para la investigación de medicamentos? ¿Crees que son fiables o es necesaria al final la etapa de prueba en animales?**

Sí es necesaria, la prueba final puede hacerse de otras maneras con idéntica fiabilidad.

7. **¿Crees que es necesaria una legislación acerca de la experimentación animal? ¿Por qué?**

Sí, pero debería ser una legislación internacional, sino no servirá de nada.

11. CONCLUSIONES

La enfermedad

La diabetes mellitus (DM) se caracteriza por la aparición de hiperglucemia secundaria a defectos en la secreción de insulina, de la acción de la insulina o ambas. Existen también una serie de DM que aparecen como consecuencia de otras enfermedades en las que se deteriora el metabolismo de la glucosa, bien por pérdida de parénquima pancreático o por la aparición de resistencia a la insulina o coexistencia de una acción glucogenolítica o neoglucogénica.

Esta enfermedad, se trate o no, es una enfermedad progresiva. Existe el control de la enfermedad pero no la curación, y, dependiendo la evolución y el grado de control que se consiga de la hiperglucemia, así como la coexistencia de otros factores, se acelerará el deterioro del diabético, agravándose su situación.

Debemos saber, que el diabético muere, fundamentalmente, por sus problemas cardiovasculares, centrados, sobre todo, en tres procesos, el infarto agudo de miocardio, el accidente vascular cerebral y en la isquemia de extremidades inferiores que desemboca en gangrena y frecuente infección grave. Conforme se va haciendo mayor el número de complicaciones, la calidad de vida del paciente va empeorando a la par que aumenta el deterioro personal, familiar, laboral y social del paciente, incrementándose a su vez el costo de la enfermedad por factores directos e indirectos. En Europa, la diabetes mellitus es responsable del 2,5 al 15% del presupuesto sanitario, lo que demuestra no sólo el elevado número de pacientes sino también el alto coste que genera la enfermedad.

En definitiva, en la DM nos encontramos ante un proceso multidisciplinar con diferentes categorizaciones patogénicas y clínicas que harán que el tratamiento de un diabético sea muy diferente al de otro, incluyendo en esto la necesidad o no de insulina exógena (en base a la producción endógena de la misma) y la existencia o no de complicaciones de los diferentes órganos y aparatos.

En la diabetes mellitus aún persisten múltiples incógnitas acerca de los acontecimientos que dan lugar a la disfunción de la célula β , tanto a nivel fisiológico como molecular. La comprensión de los mismos es imprescindible para el avance en la prevención y tratamiento de esta enfermedad. La utilización de modelos animales tanto para la diabetes tipo 1 como para la 2 ha proporcionado la ventaja de obtener gran cantidad de información valiosa acerca de la patogénesis de la enfermedad.

Como conclusión, podemos decir que el hecho de que esta enfermedad afecte a tantas personas y que hasta el momento, sólo se haya conseguido un tratamiento paliativo y no curativo, tanto para la diabetes en sí como para sus complicaciones para alargar la vida de las personas afectadas, nos hace pensar que aún queda mucho trabajo por hacer. Uno de los grandes problemas con el que nos encontramos es que a veces no es tan fácil la extrapolación de los resultados de los experimentos realizados en animales a las personas, lo que hace que aunque se encuentren soluciones para curar la enfermedad, éstas no sirven para las personas, por lo que se tendría que profundizar en este ámbito.

La legislación

Antaño, el uso de animales de experimentación de cualquier ámbito, no estaba regulado, por lo que su uso no estaba dirigido, controlado ni limitado. Ello ocasionaba una cantidad ingente de experimentos con animales, a veces repetidos, a veces innecesarios y otras veces con excelentes resultados.

A fin de poner solución a este descontrol y problema, se han promulgado un séquito de leyes tanto europeas como comunitarias, pasando por las estatales, que pretenden arrojar un poco de luz en la vida de los animales utilizados por el ser humano, en nuestro caso para la experimentación científica de enfermedades que nos afectan a los humanos.

Creemos correcto que la legislación vigente prohíba el uso de estos métodos si para ello existe otro método científico satisfactorio y factible que no requiera el uso de animales, aunque ahí quedan algunos cabos sueltos. Creemos que primeramente se debería enfatizar en encontrar e investigar estos métodos alternativos propuestos a la experimentación con animales, pues el hecho que la ley no reconozca ninguno ni exponga una lista de condicionantes para usar unos métodos u otros nos hace presuponer que estos métodos alternativos no están suficientemente desarrollados ni gozan de un uso habitual.

Por otro lado, y aunque lo encontremos acertado, el hecho que la ley indique que siempre habrá que diseñar los procedimientos de manera que permitan la utilización del menor número de animales posible puede conllevar el problema de que al final el número de animales seleccionado haya sido insuficiente y la validez de los resultados obtenidos sea discutible. Por ello es importante, mientras no se desarrollen otro tipo de métodos para la obtención de medicamentos y tratamientos efectivos, se debe hacer la experimentación animal lo más segura y eficaz posible. Ahí entran nuevos métodos más precisos de modelos estadísticos, que pretenden afinar al máximo el número de animales a utilizar, los justos y necesarios para obtener los resultados esperados sin experimentar con un número demasiado limitado o demasiado excesivo de animales.

Una vez establecida la legislación europea, España solamente se limitó a trasladar dicha directiva al Estado. A otro nivel, las diferentes autonomías españolas se limitaron del mismo modo a aplicar la legislación española, y a su vez europea, sin modificaciones en la mayoría de los casos. No obstante, la comunidad de Cataluña optó por aplicar modificaciones a la legislación vigente obligando a la creación de una comisión de experimentación animal y un comité ético de experimentación animal, pues estos dos tipos de asociaciones ya se mencionaban en la legislación europea y española pero no se establecía su formación ni funcionamiento. Diez años más tarde, el estado español decidió modificar su legislación basándose en las mejoras adoptadas por la comunidad catalana, pues resolvía las incongruencias de la ley anterior. Visto esto, consideramos positivo el hecho que las Directivas europeas permitan la realización de modificaciones en su transposición para acotar o endurecer las leyes, pues de este modo es posible un mejor ajuste de éstas según la población y situación en las que serán aplicadas. Creemos acertada la modificación que hizo la comunidad de Cataluña, pues esto está permitiendo un mayor control, en lo que a los animales se refiere, en el campo de la experimentación.

Consideramos totalmente imprescindible el hecho de disponer de material legislativo que ampare el trato y el bienestar de los animales usados en experimentación, pues aunque las metas de dichos experimentos sean muy trascendentes, no siempre el fin justifica los medios.

Nos parece incoherente que la actual directiva europea no atañe a la Directiva 76/768/CEE del Consejo de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos, pues consideramos que a investigación o testaje de productos en animales también es una modalidad de experimentación animal en la que estos últimos pueden igualmente ver vulnerado su estado de salud y bienestar. Por este motivo, consideramos que dicha directiva debería ser de aplicación en el campo de la investigación cosmética para complementar y/o enmendar la antigua directiva 76/768/CEE del Consejo.

Para terminar, consideramos que los animales de experimentación sí se encuentran amparados por la legislación vigente, pero que aún hay mucho por hacer, empezando por encontrar procedimientos alternativos de experimentación y la consiguiente actualización de la legislación para obligar su aplicación siempre que sea posible.

Cuestiones éticas

La verdad es que sacar una conclusión acerca de la ética que envuelve la experimentación animal, es, como mínimo, complejo y con multitud de opiniones.

Por un lado tenemos lados totalmente opuestos y extremos, donde unos promueven que la experimentación animal debería estar totalmente prohibida en todas sus formas, como otros que aseguran que no debería existir ningún tipo de control o limitación en ésta. Unos piensan que la experimentación animal no es más que una forma de esclavitud sobre seres que no pueden decidir ni hacer valer sus derechos, y otros, justamente en el lado opuesto, piensan que dichos seres carecen de derechos... Es un tema controvertido, con miles de puntos de vista que cada uno considera válido desde su perspectiva.

Tal como hemos podido ver en las encuestas poblacionales, las respuestas son muy variadas en todos los ámbitos, pero si es cierto que hay una tendencia de pensamiento según el nivel cultural de los encuestados (en el campo científico). No nos pondremos a comentar qué piensan nuestros encuestados sobre la experimentación animal en el mundo de la diabetes y en general, pero sí queremos hacer nuestra aportación al respecto.

El ser humano, tiene, intrínsecamente, como todas las especies, una necesidad y deseo intrínsecos por sobrevivir; para ser más exactos, por VIVIR. Para ello, es evidente que una de las espinas más problemáticas es el campo de la salud y la alimentación, y es por ello que el ser humano necesita encontrar soluciones a este problema: curar y diagnosticar enfermedades, entenderlas y tratarlas, hacer transfusiones y detectar infecciones, y un largo etc. Y hoy en día, debido a nuestras bases científicas y tecnológicas, es evidente que el único sistema que funciona para lograr todo esto es la experimentación animal. No hay, de momento, un método alternativo eficaz, seguro y viable para ello.

Por eso, es imprescindible, mientras no haya un cambio de paradigma radical, intentar ser lo más precisos posibles en el campo de la investigación, regularla al máximo y evitar hacer experimentos repetitivos, infructuosos o erróneos, pues hoy en día, es lo máximo que se puede hacer.

Nos gustaría hacer algunas reflexiones: ¿qué hay de la gente que va a la farmacia a comprar medicamentos o se diagnostica de alguna enfermedad o recibe transfusiones testadas previamente para evitar el rechazo y luego está en contra categóricamente de la experimentación animal? ¿Eso no sería practicar hipocresía? ¿No sería equiparable a alguien que estuviese en contra de las industrias de piel y luego llevase un abrigo de visón? Evidentemente no se puede comparar la salud con un abrigo, pero el concepto es similar. ¿Qué pasaría si aquella gente que está en contra de la experimentación animal se le negase acceder a los medicamentos, por ejemplo? ¿O si sólo aquellas personas que están a favor pudiesen llegar a ellos? Realmente sería algo totalmente injusto y evidentemente no estaríamos a favor ni mucho menos. Simplemente queremos dejar estas reflexiones aquí, porque cada uno es totalmente libre de tener las creencias que quiera, pero también es cierto, que muchas veces carecemos de coherencia y sentido común.

Por todo ello, creemos que la experimentación animal es necesaria, tanto en el campo de la diabetes como en otros muchos campos, pero también creemos firmemente que debe controlarse y hacerse lo mejor posible, pasando aquellos controles que sean necesarios, evitando al máximo el dolor a los animales y garantizándoles el bienestar sin escatimar esfuerzos. Y esto es algo que deberíamos conocer todos. Hemos llegado a un punto en esta sociedad donde todo el mundo es capaz de opinar de todo, pero sin saber de nada. No hay manera más efectiva de tener una idea equivocada que el desconocimiento de la misma.

12. BIBLIOGRAFIA

Legislación:

Europea

- UE. Directiva 86/609/CEE del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *DO L 358 de 18.12.1986, p. 1/28 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT)*
- UE. RECTIFICACIÓN A 86/609/CEE: Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *DO L 117 de 5.5.1987, p. 31/31 (ES)*
- UE. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Texto pertinente a efectos del EEE. *DO L 276 de 20.10.2010, p. 33/79 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV)*
- UE. Corrección de errores de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010). *DO L 163 de 22.6.2012, p. 19/21 (ES, SV)*
- European Council. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. *CETS* núm. 123 de 18/3/1986 (48 págs.)
- European Council. Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. *CETS* núm. 170 de 22/6/1998 (7 págs.)

Española

- España. Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 67 de 18 de marzo de 1988, páginas 8509 a 8512 (4 págs.)
- España. Orden de 13 de octubre de 1989 por la que se establecen las normas de registro de los establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación de titularidad estatal, así como los de autorización para el empleo de animales en experimentos, en desarrollo del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 250 de 18 de octubre de 1989, páginas 32682 a 32683 (2 págs.)

- España. Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 252 de 21 de octubre de 2005, páginas 34367 a 34391 (25 págs.)
- España. Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 268 de 8 de noviembre de 2007, páginas 45914 a 45920 (7 págs.).

Catalana

- Cataluña. Ley 5/1995, de 21 de junio, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 190 de 10 de agosto de 1995, páginas 24935 a 24940 (6 págs.)
- Cataluña. DECRETO 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas. *DOGC* núm. 2450 del 7/8/1997, p. 9169 a 9175 (7 págs.).
- Cataluña. DECRETO 286/1997, de 31 de octubre, de modificación del Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas. *DOGC* núm. 2518 del 14/11/1997, p. 12865.
- Cataluña. DECRETO 164/1998, de 8 de julio, de modificación del Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y otras finalidades científicas. *DOGC*, núm. 2680 del 14/7/1998, p. 8654.

Otras

- UNESCO. Universal Declaration of Animal Rights. UNESCO sources; 56. Publ.: 1994; p. 6-16, illus.
- CIOMS. International guiding principles for biomedical research involving animals. CIOMS, ISBN: 9290360194. (28 págs.)

Libros:

- FIGUEROLA, Daniel. *Diabetes*. 4a ed., Barcelona (España): Masson, 2003. ISBN 84-458-1300-5.
- TÉBAR MASSÓ, Francisco Javier y ESCOBAR JIMÉNEZ, Fernando. *La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica*. Madrid (España): Médica Panamericana, 2009. ISBN 978-84-7903-450-4.

Artículos:

- ANDERSON, H. R. *et al.* **Induction of alloxan/streptozotocin diabetes in dogs: A revised experimental technique.** *Laboratory Animals* (1993). 27, pp. 281-285.
- ARIAS DÍAZ J. Y BALIBREA J. **Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2.** *Nutr. Hosp. (Madrid)*. 2007, vol.22, n.2, pp. 160-68. ISSN 0212-1611.
- CARREÑO HERNANDEZ, M. C. *et al.* **Manejo del paciente diabético hospitalizado.** *An. Med. Interna (Madrid)*. 2005, vol.22, n.7, pp. 339-348. ISSN 0212-7199.
- HUGUES HERNANDORENA, B. **Animales de laboratorio en la endocrinología: biomodelos de la diabetes mellitus tipo 1.** *Rev. Cubana Endocrinol* (2001), 12 (3), pp. 168-177.
- LENZEN, S. **The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.** *Diabetologia* (2008), 51, pp. 216-226.
- MORTON, D. B. **Punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos.** *Laboratory Animals* (2005), 8, pp. 5-12.
- RAMOS RODRÍGUEZ, H. G. y DOMINGO MÉNDEZ, J. **Diabetes mellitus experimental.** *Ciencia veterinaria* (1994), pp. 347-377.
- REES, D. A y ALCOLADO, J. C. **Animal models of diabetes mellitus.** *Diabetic Medicine* (2005), 22, pp. 359-370.
- RUÍZ RAMOS M. *et al.* **La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades.** *Vivir, enfermar y morir en una sociedad opulenta, parte I. Gac. Sanit. (Sevilla)*. 2006, vol. 20, supl. 1, pp. 15-24.

Páginas web:

- www.secal.es (Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio)
- www.cnb.csic.es (Centro Nacional de Biotecnología, CNB y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC).

**EUROPEAN CONVENTION FOR THE
PROTECTION OF VERTEBRATE ANIMALS
USED FOR EXPERIMENTAL AND OTHER
SCIENTIFIC PURPOSES**

Strasbourg, 18.III.1986

**Text amended according to the provisions of the Protocol (ETS No. 170), as
of its entry into force, on 2 December 2005.**

Preamble

The member States of the Council of Europe, signatory hereto,

Recalling that the aim of the Council of Europe is to achieve a greater unity between its members and that it wishes to co-operate with other States in the protection of live animals used for experimental and other scientific purposes;

Recognising that man has a moral obligation to respect all animals and to have due consideration for their capacity for suffering and memory;

Accepting nevertheless that man in his quest for knowledge, health and safety has a need to use animals where there is a reasonable expectation that the result will be to extend knowledge or be to the overall benefit of man or animal, just as he uses them for food, clothing and as beasts of burden;

Resolved to limit the use of animals for experimental and other scientific purposes, with the aim of replacing such use wherever practical, in particular by seeking alternative measures and encouraging the use of these alternative measures;

Desirous to adopt common provisions in order to protect animals used in those procedures which may possibly cause pain, suffering, distress or lasting harm and to ensure that where unavoidable they shall be kept to a minimum,

Have agreed as follows:

Part I – General principles**Article 1**

- 1 This Convention applies to any animal used or intended for use in any experimental or other scientific procedure where that procedure may cause pain, suffering, distress or lasting harm. It does not apply to any non-experimental agricultural or clinical veterinary practice.
- 2 In this Convention:
 - a “animal”, unless otherwise qualified, means any live non-human vertebrate, including free-living and/or reproducing larval forms, but excluding other foetal or embryonic forms;
 - b “intended for use” means bred or kept for the purpose of sale, disposal or use in any experimental or other scientific procedure;
 - c “procedure” means any experimental or other scientific use of an animal which may cause it pain, suffering, distress or lasting harm, including any course of action intended to, or liable to, result in the birth of an animal in any such conditions, but excluding the least painful methods accepted in modern practice (that is “humane” methods) of killing or marking an animal.

A procedure starts when an animal is first prepared for use and ends when no further observations are made for that procedure; the elimination of pain, suffering, distress or lasting harm by the successful use of anaesthesia or analgesia or other methods does not place the use of an animal outside the scope of this definition;

- d “competent person” means any person who is considered by a Party to be competent in its territory to perform the relevant function described in this Convention;
- e “responsible authority” means, in the territory of a given Party, any authority, body or person designated for the relevant purpose;
- f “establishment” means any stable or mobile facility, any building, group of buildings or other premises, including a place which is not wholly enclosed or covered;
- g “breeding establishment” means any establishment where animals are bred with a view to their use in procedures;
- h “supplying establishment” means any establishment, other than a breeding establishment, from which animals are supplied with a view to their use in procedures;
- i “user establishment” means any establishment where animals are used in procedures;
- j “humane method of killing” means the killing of an animal with a minimum of physical and mental suffering appropriate to the species.

Article 2

A procedure may be performed for one or more of the following purposes only and subject to the restrictions laid down in this Convention:

- a
 - i avoidance or prevention of disease, ill-health or other abnormality, or their effects, in man, vertebrate or invertebrate animals or plants, including the production and the quality, efficacy and safety testing of drugs, substances or products;
 - ii diagnosis or treatment of disease, ill-health or other abnormality, or their effects, in man, vertebrate or invertebrate animals or plants;
- b detection, assessment, regulation or modification of physiological conditions in man, vertebrate and invertebrate animals or plants;
- c protection of the environment;
- d scientific research;
- e education and training;
- f forensic inquiries.

Article 3

Each Party undertakes to take all the necessary steps to give effect to the provisions of this Convention and to ensure an effective system of control and supervision as soon as possible and in any case within a period of five years from the date of entry into force of the present Convention in respect of that Party.

Article 4

No provision in this Convention shall affect the liberty of the Parties to adopt stricter measures for the protection of animals used in procedures or for the control and restriction of the use of animals in procedures.

Part II – General care and accommodation**Article 5**

- 1 Any animal used or intended for use in a procedure shall be provided with accommodation, an environment, at least a minimum degree of freedom of movement, food, water and care, appropriate to its health and well-being. Any restriction on the extent to which an animal can satisfy its physiological and ethological needs shall be limited as far as practicable. In the implementation of this provision, regard should be paid to the guidelines for accommodation and care of animals set out in Appendix A to this Convention.
- 2 The environmental conditions in which animals are bred, kept or used shall be checked daily.
- 3 The well-being and state of health of animals shall be observed sufficiently closely and frequently to prevent pain or avoidable suffering, distress or lasting harm.
- 4 Each Party shall determine arrangements to ensure that any defect or suffering discovered is corrected as quickly as possible.

Part III – Conduct of procedure**Article 6**

- 1 A procedure shall not be performed for any of the purposes referred to in Article 2, if another scientifically satisfactory method, not entailing the use of an animal, is reasonably and practicably available.
- 2 Each Party should encourage scientific research into the development of methods which could provide the same information as that obtained in procedures.

Article 7

When a procedure has to be performed, the choice of species shall be carefully considered and, where required, be explained to the responsible authority; in a choice between procedures, those should be selected which use the minimum number of animals, cause the least pain, suffering, distress or lasting harm and which are most likely to provide satisfactory results.

Article 8

A procedure shall be performed under general or local anaesthesia or analgesia or by other methods designed to eliminate as far as practicable pain, suffering, distress or lasting harm applied throughout the procedure unless:

- a the pain caused by the procedure is less than the impairment of the animal's well-being caused by the use of anaesthesia or analgesia, or
- b the use of anaesthesia or analgesia is incompatible with the aim of the procedure. In such cases, appropriate legislative and/or administrative measures shall be taken to ensure that no such procedure is carried out unnecessarily.

Article 9

- 1 Where it is planned to subject an animal to a procedure in which it will or may experience severe pain which is likely to endure, that procedure must be specifically declared and justified to, or specifically authorised by, the responsible authority.
- 2 Appropriate legislative and/or administrative measures shall be taken to ensure that no such procedure is carried out unnecessarily.

Such measures shall include:

- either specific authorisation by the responsible authority;
- or specific declaration of such procedure to the responsible authority and judicial or administrative action by that authority if it is not satisfied that the procedure is of sufficient importance for meeting the essential needs of man or animal, including the solution of scientific problems.

Article 10

During a procedure, an animal used shall remain subject to the provisions of Article 5 except where those provisions are incompatible with the objective of the procedure.

Article 11

- 1 At the end of the procedure it shall be decided whether the animal shall be kept alive or killed by a humane method. An animal shall not be kept alive if, even though it has been restored to normal health in all other respects, it is likely to remain in lasting pain or distress.
- 2 The decision referred to in paragraph 1 of this article shall be taken by a competent person, in particular a veterinarian, or the person who, in accordance with Article 13, is responsible for, or has performed, the procedure.
- 3 Where, at the end of the procedure:
 - a an animal is to be kept alive, it shall receive the care appropriate to its state of health, be placed under the supervision of a veterinarian or other competent person and kept under conditions conforming to the requirements of Article 5. The conditions laid down in this sub-paragraph may, however, be waived where, in the opinion of a veterinarian, the animal would not suffer as a consequence of such exemption;

- b an animal is not to be kept alive or cannot benefit from the provisions of Article 5 for its well-being, it shall be killed by a humane method as soon as possible.
- 4 No animal which has been used in a procedure entailing severe or enduring pain or suffering, irrespective of whether anaesthesia or analgesia was employed, shall be used in a further procedure unless it has returned to good health and well-being and either:
 - a the further procedure is one in which the animal is subject throughout to general anaesthesia which is to be maintained until the animal is killed; or
 - b the further procedure will involve minor interventions only.

Article 12

Notwithstanding the other provisions of this Convention, where it is necessary for the legitimate purposes of the procedure, the responsible authority may allow the animal concerned to be set free provided that it is satisfied that the maximum practicable care has been taken to safeguard the animal's well-being. Procedures that involve setting the animal free shall not be permitted solely for educational or training purposes.

Part IV – Authorisation

Article 13

A procedure for the purposes referred to in Article 2 may be carried out by persons authorised, or under the direct responsibility of a person authorised, or if the experimental or other scientific project concerned is authorised in accordance with the provisions of national legislation. Authorisation shall be granted only to persons deemed to be competent by the responsible authority.

Part V – Breeding or supplying establishments

Article 14

Breeding and supplying establishments shall be registered with the responsible authority subject to the grant of an exemption under Article 21 or Article 22. Such registered establishments shall comply with the requirements of Article 5.

Article 15

The registration provided for in Article 14 shall specify the person in charge of the establishment, who shall be competent to administer or arrange for suitable care for animals of the species bred or kept in the establishment.

Article 16

- 1 Arrangements shall be made at registered breeding establishments to record, in respect of the animals bred there, the number and species of such animals leaving, the dates they leave and the name and address of the recipient.

- 2 Arrangements shall be made at registered supplying establishments to record the number and species of such animals entering and leaving, the dates of these movements, from whom the animals concerned were acquired and the name and address of the recipient.
- 3 The responsible authority shall prescribe the records which are to be kept and made available to it by the person in charge of the establishments mentioned in paragraphs 1 and 2 of this article. Such records shall be kept for a minimum of three years from the date of the last entry.

Article 17

- 1 Each dog and cat in an establishment shall be individually and permanently marked in the least painful manner possible before it is weaned.
- 2 Where an unmarked dog or cat is taken into an establishment for the first time after it has been weaned, it shall be marked as soon as possible.
- 3 Where a dog or cat is transferred from one establishment to another before it is weaned and it is not practical to mark it beforehand, a full documentary record, specifying in particular its mother, shall be kept until it can be marked.
- 4 Particulars of the identity and origin of each dog or cat shall be entered in the records of the establishment.

Part VI – User establishments

Article 18

User establishments shall be registered with or otherwise approved by the responsible authority and shall comply with the conditions laid down in Article 5.

Article 19

Provisions shall be made at user establishments for installations and equipment appropriate for the species of animals used and the performance of the procedures conducted there. The design, construction and functioning of such installations and equipment shall be such as to ensure that the procedures are performed as effectively as possible, with the object of obtaining consistent results with the minimum number of animals and the minimum degree of pain, suffering, distress or lasting harm.

Article 20

In user establishments:

- a the person or persons who are administratively responsible for the care of the animals and the functioning of the equipment shall be identified;
- b sufficient trained staff shall be provided;
- c adequate arrangements shall be made for the provision of veterinary advice and treatment;
- d a veterinarian or other competent person should be charged with advisory duties in relation to the well-being of the animals.

Article 21

- 1 Animals of the species listed below which are for use in procedures shall be acquired directly from or originate from registered breeding establishments, unless a general or special exemption has been obtained under arrangements to be determined by the Party:

Mouse	<i>Mus musculus</i>
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>
Guinea pig	<i>Cavia porcellus</i>
Golden hamster	<i>Mesocricetus auratus</i>
Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
Dog	<i>Canis familiaris</i>
Cat	<i>Felis catus</i>
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>

- 2 Each Party undertakes to extend the provisions of paragraph 1 of this article to other species, in particular of the order of primates, as soon as there is a reasonable prospect of a sufficient supply of purpose-bred animals of the species concerned.
- 3 Straying animals of a domesticated species shall not be used in procedures. A general exemption made under the conditions of paragraph 1 of this article may not extend to stray dogs and cats.

Article 22

In user establishments, only animals supplied from registered breeding or supplying establishments shall be used, unless a general or special exemption has been obtained under arrangements to be determined by the Party.

Article 23

Procedures may, where authorised by the responsible authority, be conducted outside user establishments.

Article 24

Arrangements shall be made at user establishments to maintain records and make them available as required by the responsible authority. In particular, these records shall be sufficient to meet the requirements of Article 27 and, in addition, show the number and species of all animals acquired, from whom they were acquired and their date of arrival.

Part VII – Education and training**Article 25**

- 1 Procedures carried out for the purpose of education, training or further training for professions or other occupations, including the care of animals being used or intended for use in procedures, must be notified to the responsible authority and shall be carried out by or under the supervision of a competent person, who will be responsible for ensuring that the procedures comply with national legislation under the terms of this Convention.
- 2 Procedures within the scope of education, training, or further training for purposes other than those referred to in paragraph 1 above shall not be permitted.

- 3 Procedures referred to in paragraph 1 of this article shall be restricted to those absolutely necessary for the purpose of the education or training concerned and be permitted only if their objective cannot be achieved by comparably effective audio-visual or any other suitable methods.

Article 26

Persons who carry out procedures, or take part in procedures, or take care of animals used in procedures, including supervision, shall have had appropriate education and training.

Part VIII – Statistical information

Article 27

- 1 Each Party shall collect statistical information on the use of animals in procedures and this information shall where lawful be made available to the public.
- 2 Information shall be collected in respect of:
 - a the numbers and kinds of animals used in procedures;
 - b the numbers of animals in selected categories used in procedures directly concerned with medicine and in education and training;
 - c the numbers of animals in selected categories used in procedures for the protection of man and the environment;
 - d the numbers of animals in selected categories used in procedures required by law.

Article 28

- 1 Subject to requirements of national legislation relating to secrecy and confidentiality, each Party shall communicate every year to the Secretary General of the Council of Europe information in respect of the items mentioned in paragraph 2 of Article 27, presented in the form set out in Appendix B to this Convention.
- 2 The Secretary General of the Council of Europe shall publish the statistical information received from the Parties in respect of the items mentioned in paragraph 2 of Article 27.
- 3 Each Party is invited to communicate to the Secretary General of the Council of Europe the address of its national authority from which information about more comprehensive national statistics may be obtained on request. Such addresses will be contained in the publications of statistics made by the Secretary General of the Council of Europe.

Part IX – Recognition of procedures carried out in the territory of another Party

Article 29

- 1 In order to avoid unnecessary repetition of procedures required by law on health and safety, each Party shall, where practicable, recognise the results of procedures carried out in the territory of another Party.

- 2 To that end the Parties undertake, where practicable and lawful, to render each other mutual assistance, in particular by furnishing information on their legislation and administrative practice relating to the requirements for procedures to be carried out in support of submissions for registration of products, as well as factual information on procedures carried out in their territory and on authorisation or any other administrative particulars pertaining to these procedures.

Part X – Multilateral consultations

Article 30

- 1 The Parties shall, within five years from the entry into force of this Convention and every five years thereafter, or more frequently if a majority of the Parties should so request, hold multilateral consultations within the Council of Europe to examine the application of this Convention, and the advisability of revising it or extending any of its provisions.
- 2 These consultations shall take place at meetings convened by the Secretary General of the Council of Europe. The Parties shall communicate the name of their representative to the Secretary General of the Council of Europe at least two months before each meeting.
- 3 Subject to the provisions of this Convention, the Parties shall draw up the rules of procedure for the consultations.

Part XI – Amendments

Article 31

- 1 Any amendment to Appendices A and B, proposed by a Party or by the Committee of Ministers of the Council of Europe shall be communicated to the Secretary General of the Council of Europe and forwarded by him to the member States of the Council of Europe, to the European Community and to any non-member State which has acceded to, or has been invited to accede to the Convention in accordance with the provisions of Article 34.
- 2 Any amendments proposed in accordance with the provisions of the preceding paragraph shall be examined, not less than six months after the date of forwarding by the Secretary General, at a multilateral consultation where it may be adopted by a two-thirds majority of the Parties. The text adopted shall be forwarded to the Parties.
- 3 Twelve months after its adoption at a multilateral consultation, any amendment shall enter into force unless one third of the Parties have notified objections.

Part XII – Final Provisions

Article 32

This Convention shall be open for signature by the member States of the Council of Europe and by the European Communities. It is subject to ratification, acceptance or approval. Instruments of ratification, acceptance or approval shall be deposited with the Secretary General of the Council of Europe.

Article 33

- 1 This Convention shall enter into force on the first day of the month following the expiration of a period of six months after the date on which four member States of the Council of Europe have expressed their consent to be bound by the Convention in accordance with the provisions of Article 32.
- 2 In respect of a Signatory which subsequently expresses its consent to be bound by it, the Convention shall enter into force on the first day of the month following the expiration of a period of six months after the date of the deposit of the instrument of ratification, acceptance or approval.

Article 34

- 1 After the entry into force of this Convention, the Committee of Ministers of the Council of Europe may invite any State not a member of the Council to accede to this Convention, by a decision taken by the majority provided for in Article 20.d of the Statute of the Council of Europe and by the unanimous vote of the representatives of the Contracting States entitled to sit on the Committee.
- 2 In respect of any acceding State, the Convention shall enter into force on the first day of the month following the expiration of a period of six months after the date of deposit of the instrument of accession with the Secretary General of the Council of Europe.

Article 35

- 1 Any Signatory may, at the time of signature or when depositing its instrument of ratification, acceptance, approval or accession, make one or more reservations. No reservations may, however, be made in respect of Articles 1 to 14 or Articles 18 to 20.
- 2 Any Party which has made a reservation under the preceding paragraph may wholly or partly withdraw it by means of a notification addressed to the Secretary General of the Council of Europe. The withdrawal shall take effect on the date of receipt of such notification by the Secretary General.
- 3 A Party which has made a reservation in respect of a provision of this Convention may not claim the application of that provision by any other Party; it may, however, if its reservation is partial or conditional, claim the application of that provision insofar as it has itself accepted it.

Article 36

- 1 Any Signatory may, at the time of signature or when depositing its instrument of ratification, acceptance, approval or accession, specify the territory or territories to which this Convention shall apply.
- 2 Any Party may at any later date, by a declaration addressed to the Secretary General of the Council of Europe, extend the application of this Convention to any other territory specified in the declaration. In respect of such territory, the Convention shall enter into force on the first day of the month following the expiration of a period of six months after the date of receipt of such declaration by the Secretary General.
- 3 Any declaration made under the two preceding paragraphs may, in respect of any territory specified in such declaration, be withdrawn by a notification addressed to the Secretary General. The withdrawal shall become effective on the first day of the month following the expiration of a period of six months after the date of receipt of such notification by the Secretary General.

Article 37

- 1 Any Party may at any time denounce this Convention by means of a notification addressed to the Secretary General of the Council of Europe.
- 2 Such denunciation shall become effective on the first day of the month following the expiration of a period of six months after the date of receipt of the notification by the Secretary General.

Article 38

The Secretary General of the Council of Europe shall notify the member States of the Council of Europe, the European Communities and any State which has acceded to this Convention of:

- a any signature;
- b the deposit of any instrument of ratification, acceptance, approval or accession;
- c any date of entry into force of this Convention in accordance with Articles 33, 34 and 36;
- d any other act, notification or communication relating to this Convention;

In witness whereof the undersigned, being duly authorised thereto, have signed this Convention.

Done at Strasbourg, this 18th day of March 1986, in English and French, both texts being equally authentic, in a single copy which shall be deposited in the archives of the Council of Europe. The Secretary General of the Council of Europe shall transmit certified copies to each member State of the Council of Europe, to the European Communities and to any State invited to accede to this Convention.

APPENDIX A

Guidelines for accomodation and care of animals
(Article 5 of the Convention)

CONTENTS

Introduction

1. *The physical facilities*
 - 1.1. Functions and general design
 - 1.2. Holding rooms
 - 1.3. Laboratories and general and special purpose procedure rooms
 - 1.4. Service rooms
2. *The environment in the holding rooms and its control*
 - 2.1. Ventilation
 - 2.2. Temperature
 - 2.3. Humidity
 - 2.4. Lighting
 - 2.5. Noise
 - 2.6. Alarm systems
3. *Care*
 - 3.1. Health
 - 3.2. Capture
 - 3.3. Packing and transport conditions
 - 3.4. Reception and unpacking
 - 3.5. Quarantine, isolation and acclimatisation
 - 3.6. Caging
 - 3.7. Feeding
 - 3.8. Water
 - 3.9. Bedding
 - 3.10. Exercising and handling
 - 3.11. Cleaning
 - 3.12. Humane killing of animals

Introduction

- 1 The member States of the Council of Europe have decided that it is their aim to protect live animals used for experimental and other scientific purposes to ensure that any possible pain, suffering, distress or lasting harm inflicted upon them, as a consequence of procedures being conducted upon them, shall be kept at a minimum.
- 2 It is true that some procedures are conducted under field conditions on free-living, self-supporting, wild animals, but such procedures are relatively few in number. The great majority of animals used in procedures must for practical reasons be kept under some sort of physical control in facilities ranging from outdoor corrals to cages for small animals in a laboratory animal house. This is a situation where there are highly conflicting interests. On the one hand, the animal whose needs in respect of movement, social relations and other manifestations of life must be restricted, on the other hand, the experimenter and his assistants who demand full control of the animal and its environment. In this confrontation of interests the animal may sometimes be given secondary consideration.
- 3 Therefore, the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental or Other Scientific Purposes provides in Article 5 that: "Any animal used or intended for use in a procedure shall be provided with accommodation, an environment, at least a minimum degree of freedom of movement, food, water and care, appropriate to its health and well-being. Any restriction on the extent to which an animal can satisfy its physiological and ethological needs shall be limited as far as practicable."
- 4 This appendix draws up certain guidelines based on present knowledge and practice for the accommodation and care of animals. It explains and supplements the basic principles adopted in Article 5. The object is thus to help authorities, institutions and individuals in their pursuit of the aims of the Council of Europe in this matter.
- 5 Care is a word which, when used in connection with animals intended for or in actual use in procedures, covers all aspects of the relationship between animals and man. Its substance is the sum of material and non-material resources mobilised by man to obtain and maintain an animal in a physical and mental state where it suffers least and performs best in procedures. It starts from the moment the animal is destined to be used in procedures and continues until it is humanely killed or otherwise disposed of by the establishment in accordance with Article 11 of the Convention after the close of the procedure.
- 6 The appendix aims to give advice about the design of appropriate animal quarters. There are, however, several methods of breeding and keeping laboratory animals that differ chiefly in the degree of control of the microbiological environment. It has to be borne in mind that the staff concerned will sometimes have to judge from the character and condition of the animals where the recommended standards of space may not be sufficient, as with especially aggressive animals. In applying the guidelines described in this appendix, the requirements of each of these situations should be taken into account. Furthermore, it is necessary to make clear the status of these guidelines. Unlike the provisions of the Convention itself, they are not mandatory: they are recommendations to be used with discretion, designed as guidance to the practices and standards which all concerned should conscientiously strive to achieve. It is for this reason that the term "should" has had to be used throughout the text even where "must" might seem to be the more appropriate word. For example, it is self-evident that food and water must be provided (see 3.7.2 and 3.8).
- 7 Finally, for practical and financial reasons, existing animal quarters' equipment should not need to be replaced before it is worn out, or has otherwise become useless. Pending replacement with equipment conforming with the present guidelines, these should as far as practicable be complied with by adjusting the numbers and sizes of animals placed in existing cages and pens.

Definitions

In this Appendix A, in addition to the definitions contained in Article 1.2 of the Convention:

- a “holding rooms” mean rooms where animals are normally housed, either for breeding and stocking or during the conduct of a procedure;
- b “cage” means a permanently fixed or movable container that is closed by solid walls and, at least on one side, by bars or meshed wire or, where appropriate, nets and in which one or more animals are kept or transported; depending on the stocking density and the size of the container, the freedom of movement of the animals is relatively restricted;
- c “pen” means an area enclosed, for example, by walls, bars or meshed wire in which one or more animals are kept; depending on the size of the enclosure and the stocking density the freedom of movement of the animals is usually less restricted than in a cage;
- d “run” means an area closed, for example, by fences, walls, bars or meshed wire and frequently situated outside permanently fixed buildings in which animals kept in cages or pens can move freely during certain periods of time in accordance with their ethological and physiological needs, such as exercise;
- e “stall” means a small enclosure with three sides, usually a feed-rack and lateral separations, where one or two animals may be kept tethered.

1 The physical facilities

1.1. Functions and general design

- 1.1.1. Any facility should be so constructed as to provide a suitable environment for the species housed. It should also be designed to prevent access by unauthorised persons.

Facilities that are part of a larger building complex should also be protected by proper building measures and arrangements that limit the number of entrances and prevent unauthorised traffic.

- 1.1.2. It is recommended that there should be a maintenance programme for the facilities in order to prevent any defect of equipment.

1.2. Holding rooms

- 1.2.1. All necessary measures should be taken to ensure regular and efficient cleaning of the rooms and the maintenance of a satisfactory hygienic standard. Ceilings and walls should be damage-resistant with a smooth, impervious and easily washable surface. Special attention should be paid to junctions with doors, ducts, pipes and cables. Doors and windows, if any, should be constructed or protected so as to keep out unwanted animals. Where appropriate, an inspection window may be fitted in the door. Floors should be smooth, impervious and have a non-slippery, easily washable surface which can carry the weight of racks and other heavy equipment without being damaged. Drains, if any, should be adequately covered and fitted with a barrier which will prevent animals from gaining access.

- 1.2.2. Rooms where the animals are allowed to run freely should have walls and floors with a particularly resistant surface material to stand up to the heavy wear and tear caused by the animals and the cleaning process. The material should not be detrimental to the health of the animals and be such that the animals cannot hurt themselves. Drains are desirable in such rooms. Additional protection should be given to any equipment or fixtures so that they may not be damaged by the animals or hurt the animals themselves. Where outdoor exercise areas are provided measures should be taken when appropriate to prevent access by the public and animals.
- 1.2.3. Rooms intended for the holding of farm animals (cattle, sheep, goats, pigs, horses, poultry, etc.) should at least conform with the standards laid down in the European Convention for the Protection of Animals kept for Farming Purposes and by national veterinary and other authorities.
- 1.2.4. The majority of holding rooms are usually designed to house rodents. Frequently such rooms may also be used to house larger species. Care should be taken not to house together species which are incompatible.
- 1.2.5. Holding rooms should be provided with facilities for carrying out minor procedures and manipulations, where appropriate.
- 1.3. Laboratories and general and special purpose procedure rooms
 - 1.3.1. At breeding or supplying establishments suitable facilities for making consignments of animals ready for dispatch should be made available.
 - 1.3.2. All establishments should also have available as a minimum laboratory facilities for the carrying out of simple diagnostic tests, post-mortem examinations, and/or the collection of samples which are to be subjected to more extensive laboratory investigations elsewhere.
 - 1.3.3. Provision should be made for the receipt of animals in such a way that incoming animals do not put at risk animals already present in the facility, for example by quarantining. General and special purpose procedure rooms should be made available for situations where it is undesirable to carry out the procedures or observations in the holding room.
 - 1.3.4. There should be appropriate accommodation for enabling animals which are ill or injured to be housed separately.
 - 1.3.5. Where appropriate, there should be provision for one or more separate rooms suitably equipped for the performance of surgical procedures under aseptic conditions. There should be facilities for post-operative recovery where this is warranted.
- 1.4. Service rooms
 - 1.4.1. Store rooms for food should be cool and dry, vermin and insect proof and those for bedding, dry, vermin and insect proof. Other materials, which may be contaminated or present a hazard, should be stored separately.
 - 1.4.2. Store rooms for clean cages, instruments and other equipment should be available.

- 1.4.3. The cleaning and washing room should be large enough to accommodate the installations necessary to decontaminate and clean used equipment. The cleaning process should be arranged so as to separate the flow of clean and dirty equipment to prevent the contamination of newly cleaned equipment. Walls and floors should be covered with a suitably resistant surface material and the ventilation system should have ample capacity to carry away the excess heat and humidity.
- 1.4.4. Provision should be made for the hygienic storage and disposal of carcasses and animal waste. If incineration on the site is not possible or desirable, suitable arrangements should be made for the safe disposal of such material having regard to local regulation and by-laws. Special precautions should be taken with highly toxic or radioactive waste.
- 1.4.5. The design and construction of circulation areas should correspond to the standards of the holding rooms. The corridors should be wide enough to allow easy circulation of movable equipment.

2 The environment in the holding room and its control

2.1. Ventilation

- 2.1.1. Holding rooms should have an adequate ventilation system which should satisfy the requirements of the species housed. The purpose of the ventilation system is to provide fresh air and to keep down the level of odours, noxious gases, dust and infectious agents of any kind. It also provides for the removal of excess heat and humidity.
- 2.1.2. The air in the room should be renewed at frequent intervals. A ventilation rate of 15-20 air changes per hour is normally adequate. However, in some circumstances, where stocking density is low, 8-10 air changes per hour may suffice or mechanical ventilation may not even be needed at all. Other circumstances may necessitate a much higher rate of air change. Recirculation of untreated air should be avoided. However, it should be emphasised that even the most efficient system cannot compensate for poor cleaning routines or negligence.
- 2.1.3. The ventilation system should be so designed as to avoid harmful draughts.
- 2.1.4. Smoking in rooms where there are animals should be forbidden.

2.2. Temperature

- 2.2.1. Table 1 gives the range within which it is recommended that the temperature should be maintained. It should also be emphasised that the figures apply only to adult, normal animals. Newborn and young animals will often require a much higher temperature level. The temperature of the premises should be regulated according to possible changes in the animals' thermal regulation which may be due to special physiological conditions or to the effects of the procedures.
- 2.2.2. Under the climatic conditions prevailing in Europe it may be necessary to provide a ventilation system having the capacity both to heat and cool the air supplied.
- 2.2.3. In user establishments a precise temperature control in the holding rooms may be required, because the environmental temperature is a physical factor which has a profound effect on the metabolism of all animals.

2.3. Humidity

Extreme variations in relative humidity (RH) have an adverse effect on the health and well-being of animals. It is therefore recommended that the RH level in holding rooms should be appropriate to the species concerned and should ordinarily be maintained at 55% +/- 10%. Values below 40% and above 70% RH for prolonged periods should be avoided.

2.4. Lighting

In windowless rooms, it is necessary to provide controlled lighting both to satisfy the biological requirements of the animals and to provide a satisfactory working environment. It is also necessary to have a control of the intensity and of the light-dark cycle. When keeping albino animals, one should take into account their sensitivity to light (see also 2.6).

2.5. Noise

Noise can be an important disturbing factor in the animal quarters. Holding rooms and procedure rooms should be insulated against loud noise sources in the audible and in the higher frequencies in order to avoid disturbances in the behaviour and the physiology of the animals. Sudden noises may lead to considerable change in organ functions but, as they are often unavoidable, it is sometimes advisable to provide holding and procedure rooms with a continuous sound of moderate intensity such as soft music.

2.6. Alarm systems

A facility housing a large number of animals is vulnerable. It is therefore recommended that the facility is duly protected by the installation of devices to detect fires and the intrusion of unauthorised persons. Technical defects or a break-down of the ventilation system is another hazard which could cause distress and even the death of animals, due to suffocation and overheating or, in less serious cases, have such negative effects on a procedure that it will be a failure and have to be repeated. Adequate monitoring devices should therefore be installed in connection with the heating and ventilation plant to enable the staff to supervise its operation in general. If warranted, a stand-by generator should be provided for the maintenance of life support systems for the animals and lighting in the event of a break-down or the withdrawal of supply. Clear instructions on emergency procedures should be prominently displayed. Alarms for fish tanks are recommended in case of failure of the water supply. Care should be taken to ensure that the operation of an alarm system causes as little disturbance as possible to the animals.

3 Care

3.1. Health

- 3.1.1. The person in charge of the establishment should ensure regular inspection of the animals and supervision of the accommodation and care by a veterinarian or other competent person.
- 3.1.2. According to the assessment of the potential hazard to the animals, appropriate attention should be paid to the health and hygiene of the staff.

3.2. Capture

Wild and feral animals should be captured only by humane methods and by experienced persons who have a thorough knowledge of the habits and habitats of the animals to be caught. If an anaesthetic or any other drug has to be used in the capturing operation, it should be administered by a veterinarian or other competent person. Any animal which is seriously injured should be presented as soon as possible to a veterinarian for treatment. If the animal, in the opinion of the veterinarian, can only go on living with suffering or pain it should be killed at once by a humane method. In the absence of a veterinarian, any animal which may be seriously injured should be killed at once by a humane method.

3.3. Packing and transport conditions

All transportation is undoubtedly, for the animals, a stressful experience, which should be mitigated as far as possible. Animals should be in good health for transportation and it is the duty of the sender to ensure that they are so. Animals which are sick or otherwise out of condition should never be subjected to any transport which is not necessary for therapeutic or diagnostic reasons. Special care should be exercised with female animals in an advanced state of pregnancy. Female animals which are likely to give birth during the transport or which have done so within the preceding forty-eight hours, and their offspring, should be excluded from transportation. Every precaution should be taken by sender and carrier in packing, stowing and transit to avoid unnecessary suffering through inadequate ventilation, exposure to extreme temperatures, lack of feed and water, long delays, etc. The receiver should be properly informed about the transport details and documentary particulars to ensure quick handling and reception in the place of arrival. Even in the case of States which are not Parties to the European Convention on the Protection of Animals During International Transport, strict observance of the provisions of this Convention is recommended; strict observance of national laws and regulations as well as of the regulations for live animals of the International Air Transport Association and the Animal Air Transport Association is also recommended.

3.4. Reception and unpacking

The consignments of animals should be received and unpacked without avoidable delay. After inspection, the animals should be transferred to clean cages or pens and be supplied with feed and water as appropriate. Animals which are sick or otherwise out of condition should be kept under close observation and separately from other animals. They should be examined by a veterinarian or other competent person as soon as possible and, where necessary, treated. Animals which do not have any chance to recover should be killed at once by a humane method. Finally, all animals received must be registered and marked in accordance with the provisions of Articles 16, 17 and 24 of the Convention. Transport boxes should be destroyed immediately if proper decontamination is impossible.

3.5. Quarantine, isolation and acclimatisation

3.5.1. The objects of quarantine are:

- a to protect other animals in the establishment;
- b to protect man against zoonotic infection;
- c to foster good scientific practice.

Unless the state of health of animals introduced into an establishment is satisfactory, it is recommended that they should undergo a period of quarantine. In some cases, that of rabies, for example, this period may be laid down in the national regulations of the Party. In others, it will vary and should be determined by a competent person, according to the circumstances, normally the veterinarian appointed by the establishment (see also Table 2).

Animals may be used for procedures during the quarantine period as long as they have become acclimatised to their new environment and they present no significant risk to other animals or man.

- 3.5.2. It is recommended that facilities should be set aside in which to isolate animals showing signs of or suspected of ill-health and which might present a hazard to man or to other animals.
- 3.5.3. Even when the animals are seen to be in sound health it is good husbandry for them to undergo a period of acclimatisation before being used in a procedure. The time required depends on several factors, such as the stress to which the animals have been subjected which in turn depends on several factors such as the duration of the transportation and the age of the animal. This time shall be decided by a competent person.

3.6. Caging

- 3.6.1. It is possible to make a distinction between two broad systems of housing animals.

Firstly, there is the system found in breeding, supplying and user establishments in the bio-medical field designed to accommodate animals such as rodents, rabbits, carnivores, birds and non-human primates, sometimes also ruminants, swine and horses. Suggested guidelines for cages, pens, runs and stalls suitable for such facilities are presented in Tables 3 to 13. Supplementary guidance on minimum cage areas is found in Figures 1 to 7. Furthermore, a corresponding guidance for the appraisal of the stocking density in cages is presented in Figures 8 to 22.

Secondly, there is the system frequently found in establishments conducting procedures only on farm or similar large animals. The facilities in such establishments should not be less than those required by current veterinary standards.

- 3.6.2. Cages and pens should not be made out of material that is detrimental to the health of the animals, and their design should be such that the animals cannot injure themselves and, unless they are disposable, they should be made from a resistant material adapted to cleaning and decontamination techniques. In particular attention should be given to the design of cage and pen floors which should vary according to the species and age of the animals and be designed to facilitate the removal of excreta.
- 3.6.3. Pens should be designed for the well-being of the species. They should permit the satisfaction of certain ethological needs (for example, the need to climb, hide or shelter temporarily) and be designed for efficient cleaning and freedom from contact with other animals.

3.7. Feeding

- 3.7.1. In the selection, production and preparation of feed, precautions should be taken to avoid chemical, physical and microbiological contamination. The feed should be packed in tight, closed bags, stamped with the production date when appropriate. Packing, transport and storing should also be such as to avoid contamination, deterioration or destruction. Store rooms should be cool, dark, dry and vermin and insect proof. Quickly perishable feed like greens, vegetables, fruit, meat, fish, etc. should be stored in cold rooms, refrigerators or freezers.

All feed hoppers, troughs or other utensils used for feeding should be regularly cleaned and if necessary sterilised. If moist feed is used or if the feed is easily contaminated with water, urine, etc., daily cleaning is necessary.

- 3.7.2. The feed distribution process may vary according to the species but it should be such as to satisfy the physiological needs of the animal. Provision should be made for each animal to have access to the feed.

3.8. Water

- 3.8.1. Uncontaminated drinking water should always be available to all animals. During transport, it is acceptable to provide water as part of a moist diet. Water is however a vehicle of micro-organisms and the supply should therefore be so arranged that the hazard involved is minimised. Two methods are in common use, bottles and automatic systems.

- 3.8.2. Bottles are often used with small animals like rodents and rabbits. When bottles are used, they should be made from translucent material in order to enable their contents to be monitored. The design should be wide-mouthed for easy and efficient cleaning and, if plastic material is used, it should not be leachable. Caps, stoppers and pipes should also be sterilisable and easy to clean. All bottles and accessories should be taken to pieces, cleaned and sterilised at appropriate and regular periods. It is preferable that the bottles should be replaced by clean, sterilised ones rather than be refilled in the holding rooms.

- 3.8.3. Automatic drinking systems should be regularly checked, serviced and flushed to avoid accidents and the spread of infections. If solid-bottom cages are used, care should be taken to minimise the risk of flooding. Regular bacteriological testing of the system is also necessary to monitor the quality of the water.

- 3.8.4. Water received from public waterworks contains some micro-organisms which are usually considered to be harmless unless one is dealing with microbiologically defined animals. In such cases, the water should be treated. Water supplied by public waterworks is usually chlorinated to reduce the growth of micro-organisms. Such chlorination is not always enough to keep down the growth of certain potential pathogens, as for example *Pseudomonas*. As an additional measure, the level of chlorine in the water could be increased or the water could be acidified to achieve the desired effect.

3.8.5. In fishes, amphibians and reptiles, tolerance for acidity, chlorine and many other chemicals differs widely from species to species. Therefore provision should be made to adapt the water supply for aquariums and tanks to the needs and tolerance limits of the individual species.

3.9. Bedding

Bedding should be dry, absorbent, non-dusty, non-toxic and free from infectious agents or vermin, or any other form of contamination. Special care should be taken to avoid using sawdust or bedding material derived from wood which has been treated chemically. Certain industrial by-products or waste, such as shredded paper, may be used.

3.10. Exercising and handling

3.10.1. It is advisable to take every possible opportunity to let animals take exercise.

3.10.2. The performance of an animal during a procedure depends very much on its confidence in man, something which has to be developed. The wild or feral animal will probably never become an ideal experimental animal. It is different with the domesticated animal born and raised in contact with man. The confidence once established should however be preserved. It is therefore recommended that frequent contact should be maintained so that the animals become familiar with human presence and activity. Where appropriate time should be set aside for talking, handling and grooming. The staff should be sympathetic, gentle and firm when associating with animals.

3.11. Cleaning

3.11.1. The standard of a facility depends very much on good hygiene. Clear instructions should be given for the changing of bedding in cages and pens.

3.11.2. Adequate routines for the cleaning, washing, decontamination and, when necessary, sterilisation of cages and accessories, bottles and other equipment should be established. A very high standard of cleanliness and order should also be maintained in holding, washing and storage rooms.

3.11.3. There should be regular cleaning and, where appropriate, renewal of the material forming the ground surface in outdoor pens, cages and runs to avoid them becoming a source of infection and parasite infestation.

3.12. Humane killing of animals

3.12.1. All humane methods of killing animals require expertise which can only be attained by appropriate training.

3.12.2. A deeply unconscious animal can be exsanguinated but drugs which paralyse muscles before unconsciousness occurs, those with curariform effects and electrocution without passage of current through the brain, should not be used without prior anaesthesia.

Carcass disposal should not be allowed until *rigor mortis* occurs.

Tables and figures relating to Appendix A
of the European Convention for the Protection
of Vertebrate Animals used for Experimental
and other Scientific Purposes
(Guidelines for accomodation and care of animals)

TABLE 1

*Guidelines for room temperature
(animals kept in cages, pens or indoor runs)*

Species or groups of species	Optimal range in °C
Non-human New World primates	20-28
Mouse	20-24
Rat	20-24
Syrian hamster	20-24
Gerbil	20-24
Guinea pig	20-24
Non-Human Old World primates	20-24
Quail	20-24
Rabbit	15-21
Cat	15-21
Dog	15-21
Ferret	15-21
Poultry	15-21
Pigeon	15-21
Swine	10-24
Goat	10-24
Sheep	10-24
Cattle	10-24
Horse	10-24

Note: In special cases, for example when housing very young or hairless animals, higher room temperatures than those indicated may be required.

TABLE 2*Guidelines for local quarantine periods*

Introductory note: For imported animals, all quarantine periods should be subject to the Parties' national regulations. In regard to local quarantine periods, the period should be determined by a competent person according to circumstances, normally a veterinarian appointed by the establishment.

Species	Days
Mouse	5-15
Rat	5-15
Gerbil	5-15
Guinea pig	5-15
Syrian hamster	5-15
Rabbit	20-30
Cat	20-30
Dog	20-30
Non-human primates	40-60

TABLE 3

*Guidelines for caging small rodents and rabbits
(in stock and during procedures)*

Species	Minimum cage floor area cm ²	Minimum cage height cm
Mouse	180	12
Rat	350	14
Syrian hamster	180	12
Guinea pig	600	18
Rabbit 1 kg	1 400	30
2 kg	2 000	30
3 kg	2 500	35
4 kg	3 000	40
5 kg	3 600	40

Note: "Cage height" means the vertical distance between the cage floor and the upper horizontal part of the lid or cage. When designing procedures, consideration should be given to the potential growth of the animals to ensure adequate room according to this table in all phases of the procedures.

See also Figures 1 to 5 and 8 to 12.

TABLE 4*Guidelines for caging small rodents in breeding*

Species	Minimum cage floor area for mother and litter cm ²	Minimum cage height cm
Mouse	200	12
Rat	800	14
Syrian hamster	650	12
Guinea pig	1 200	18
Guinea pig in harems	1 000 per adult	18

Note: For definition of “cage height” see note to Table 3.

TABLE 5*Guidelines for caging breeding rabbits*

Weight of doe kg	Minimum cage floor area per doe and litter m ²	Minimum cage height cm	Minimum nest box floor m ²
1	0,30	30	0,10
2	0,35	30	0,10
3	0,40	35	0,12
4	0,45	40	0,12
5	0,50	40	0,14

Note: For definition of “cage height” see note to Table 3.

The minimum cage floor area per doe and litter includes the area of the nest box floor.

See also Figure 6.

TABLE 6

*Guidelines for housing cats
(during procedures and breeding)*

Weight of cat kg	Minimum cage floor area for cat m ²	Minimum cage height cm	Minimum cage floor area per queen and litter m ²	Minimum pen floor area per queen and litter m ²
0,5-1	0,2	50	-	-
1-3	0,3	50	0,58	2
3-4	0,4	50	0,58	2
4-5	0,6	50	0,58	2

Note: The housing of cats in cages should be strictly limited. Cats confined in this way should be let out for exercising at least once a day, where it does not interfere with the procedure. Cat pens should be equipped with dirt trays, ample shelf room for resting and objects suitable for climbing and claw-trimming.

“Cage height” means the vertical distance between the highest point on the floor and the lowest point in the top of the cage.

For the purpose of calculating the minimum floor area, the shelf area may be included. The minimum cage floor area per queen and litter includes the 0,18 m² area of the kittening box.

See also Figure 7.

TABLE 7

*Guidelines for housing dogs in cages
(during procedures)*

Height of dog to point of shoulder cm	Minimum cage floor area per dog m ²	Minimum height of cage cm
30	0,75	60
40	1,00	80
70	1,75	140

Note: Dogs should not be kept in cages any longer than is absolutely necessary for the purpose of the procedure. Caged dogs should be let out for exercise at least once a day unless it is incompatible with the purpose of the procedure. A time-limit should be set beyond which a dog should not be confined without daily exercise. Exercise areas should be large enough to allow the dog freedom of movement. Grid floors should not be used in dog cages unless the procedure requires it.

In the light of the great differences in height and the limited interdependence of height and weight of various breeds of dogs, the cage height should be based on the body height to the shoulder of the individual animal. As a general rule the minimum cage height should be twice the height to the shoulder.

For definition of “cage height”, see note to Table 6.

TABLE 8

*Guidelines for housing dogs in pens
(in stock and during procedures and breeding)*

Weight of dog kg	Minimum pen floor area per dog m ²	Minimum adjacent exercise area per dog	
		up to 3 dogs m ²	more than 3 dogs m ²
<6	0,5	0,5 (1,0)	0,5 (1,0)
6-10	0,7	1,4 (2,1)	1,2 (2,9)
10-20	1,2	1,6 (2,8)	1,4 (2,6)
20-30	1,7	1,9 (3,6)	1,6 (3,3)
>30	2,0	2,0 (4,0)	1,8 (3,8)

Note: Figures in brackets give the total area per dog, that is, the pen floor area plus the adjacent exercise area. Dogs kept permanently outdoors should have access to a sheltered place to find protection against unfavourable weather conditions. Where dogs are housed on grid floors, a solid area should be provided for sleeping. Grid floors should not be used unless the procedure requires it. Partitions between pens should be such as to prevent dogs from injuring each other.

All pens should have adequate drainage.

TABLE 9

*Guidelines for caging non-human primates
(in stock and during procedures and breeding)*

Introductory note: Because of the wide variations in sizes and characteristics of primates, it is especially important to match the shape and internal fittings as well as the dimensions of their cages to their particular needs. The total volume of the cage is just as important to primates as the floor area. As a general principle, the height of a cage, at least for apes and other simians, should be its greatest dimension. Cages should be high enough at least to allow the animals to stand up erect. The minimum cage height for brachiators should be such as to allow them to swing in full extension from the ceiling without their feet touching the cage floor. Where appropriate, perches should be fitted to allow the primates to use the upper part of the cage.

Compatible primates may be kept two to a cage. Where they cannot be kept in pairs, their cages should be so placed that they can see one another, but it should also be possible to prevent this when required.

Subject to these observations, the following table constitutes a general guideline for caging the groups of species most commonly used (superfamilies *Ceboidea* and *Cercopithecoidea*).

Weight of primate kg	Minimum cage floor area for one or two animals m ²	Minimum cage height cm
<1	0,25	60
1-3	0,35	75
3-5	0,50	80
5-7	0,70	85
7-9	0,90	90
9-15	1,10	125
15-25	1,50	125

Note: For definition of “cage height”, see note to Table 6.

TABLE 10

*Guidelines for caging pigs
(in stock and during procedures)*

Weight of pig kg	Minimum cage floor area per pig m ²	Minimum cage height cm
5-15	0,35	50
15-25	0,55	60
25-40	0,80	80

Note: The table would also apply to piglets. Pigs should not be kept in cages unless absolutely necessary for the purpose of the procedure and then only for a minimum period of time.

For definition of “cage height” see note to Table 6.

TABLE 11

*Guidelines for accommodating farm animals in pens
(in stock and during procedures in user establishments)*

Species and weights kg	Minimum pen floor area m ²	Minimum pen length m	Minimum pen partition height m	Minimum pen floor area for groups m ² /animal	Minimum length of feed rack per head m
<i>Pigs</i>					
10-30	2	1,6	0,8	0,2	0,20
30-50	2	1,8	1,0	0,3	0,25
50-100	3	2,1	1,2	0,8	0,30
100-150	5	2,5	1,4	1,2	0,35
>150	5	2,5	1,4	2,5	0,40
<i>Sheep</i> < 70	1,4	1,8	1,2	0,7	0,35
<i>Goats</i> < 70	1,6	1,8	2,0	0,8	0,35
<i>Cattle</i>					
< 60	2,0	1,1	1,0	0,8	0,30
60-100	2,2	1,8	1,0	1,0	0,30
100-150	2,4	1,8	1,0	1,2	0,35
150-200	2,5	2,0	1,2	1,4	0,40
200-400	2,6	2,2	1,4	1,6	0,55
>400	2,8	2,2	1,4	1,8	0,65
<i>Adult horses</i>	13,5	4,5	1,8	-	-

TABLE 12

*Guidelines for accommodating farm animals in stalls
(in stock and during procedures in user establishments)*

Species and weight kg	Minimum stall area m ²	Minimum stall length m	Minimum stall partition m
<i>Pigs</i>			
100-150	1,2	2,0	0,9
> 150	2,5	2,5	1,4
<i>Sheep</i>			
< 70	0,7	1,0	0,9
<i>Goats</i>			
< 70	0,8	1,0	0,9
<i>Cattle</i>			
60-100	0,6	1,0	0,9
100-150	0,9	1,4	0,9
150-200	1,2	1,6	1,4
200-350	1,8	1,8	1,4
350-500	2,1	1,9	1,4
> 500	2,6	2,2	1,4
<i>Adult horses</i>	4,0	2,5	1,6

Note: Stalls should be sufficiently wide to allow an animal to lie comfortably.

TABLE 13

Guidelines for caging birds
(in stock and during procedures in user establishments)

Species and weight g	Minimum area for one bird cm ²	Minimum area for 2 birds cm ² /bird	Minimum area for 3 birds cm ² /bird	Minimum cage height cm	Minimum length of feed trough per bird cm
<i>Chickens</i>					
100-300	250	200	150	25	3
300-600	500	400	300	35	7
600-1 200	1 000	600	450	45	10
1 200-1 800	1 200	700	550	45	12
1 800-2 400	1 400	850	650	45	12
<i>(Adult males)</i>					
> 2 400	1 800	1 200	1 000	60	15
<i>Quails</i>					
120-140	350	250	200	15	4

Note: "Area" means the product of cage length and cage width measured internally and horizontally, NOT the product of the floor length and floor width.

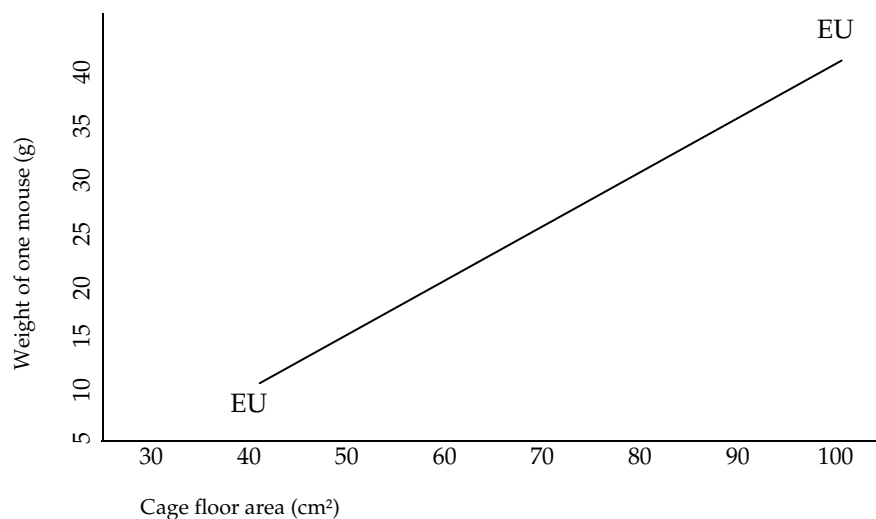
For definition of "cage height" see note to Table 6.

Mesh size in grid floors should not be greater than 10 x 10 mm for young chicks, and 25 x 25 mm for pullets and adults. The wire thickness should be at the least 2 mm. The sloping gradient should not exceed 14 % (8°). Water troughs should be of the same length as the feed troughs. If nipples or cups are provided, each bird should have access to two. Cages should be fitted with perches and allow birds in single cages to see each other.

FIGURE 1

Mice (in stock and during procedures)
Minimum cage floor area

Given the weight of a mouse, the full-drawn line, EU-EU, gives the minimum area that it should be allocated.

**FIGURE 2**

Rats (in stock and during procedures)
Minimum cage floor area

Given the weight of a rat, the full-drawn line, EU-EU, gives the minimum area that it should be allocated.

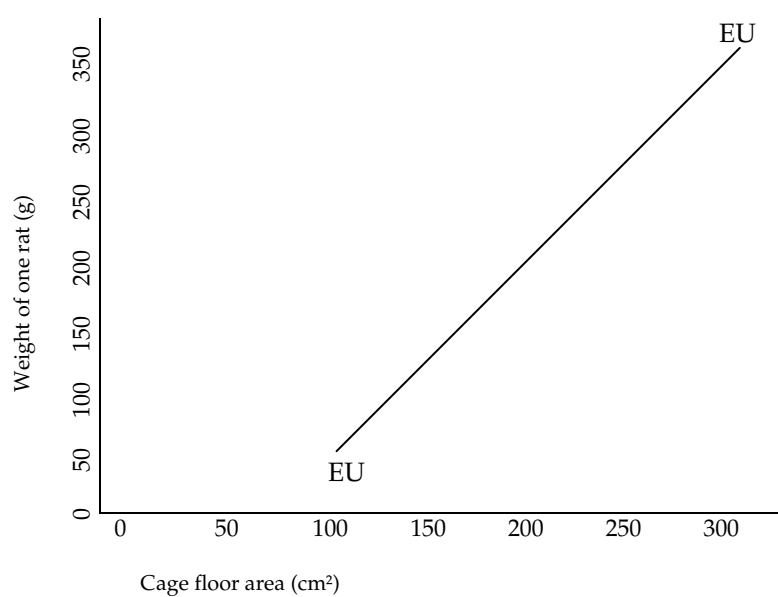
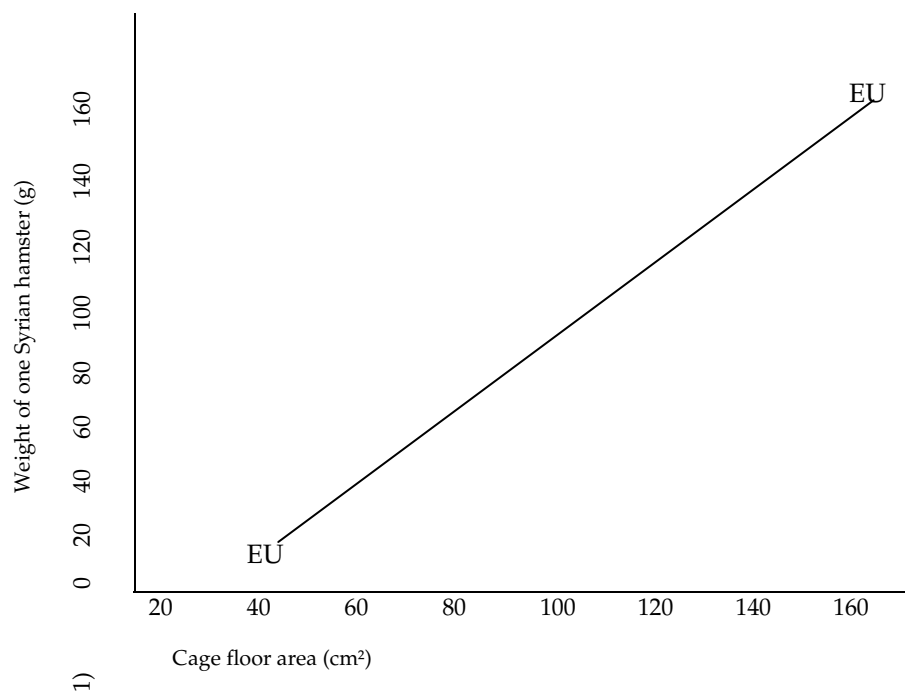


FIGURE 3

Syrian hamsters (in stock and during procedures)
Minimum cage floor area

Given the weight of a Syrian hamster the full-drawn line, EU-EU, gives the minimum area that it should be allocated.

**FIGURE 4**

Guinea pigs (in stock and during procedures)
Minimum cage floor area

Given the weight of a guinea pig, the full-drawn line, EU-EU, gives the minimum area that it should be allocated.

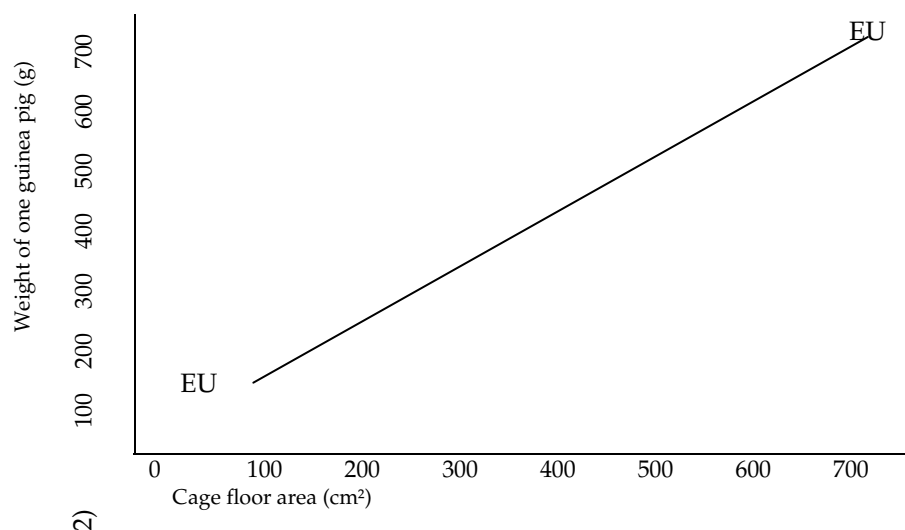
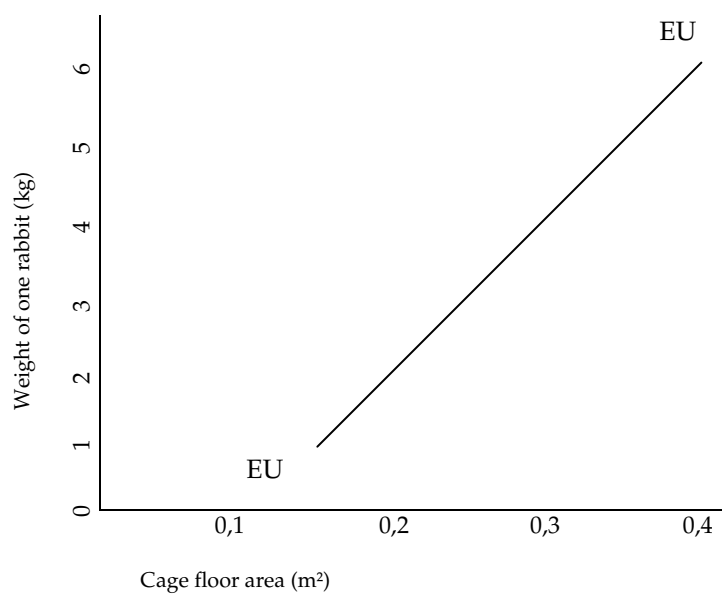


FIGURE 5

Rabbits (in stock and during procedures)
Minimum cage floor area

Given the weight of a rabbit, the full-drawn line, EU-EU, gives the minimum area it should be allocated.

**FIGURE 6**

Rabbits (in breeding)
Minimum cage floor area for doe with unweaned litter

Given the weight of a doe, the full-drawn line, EU-EU, gives the minimum area it should be allocated.

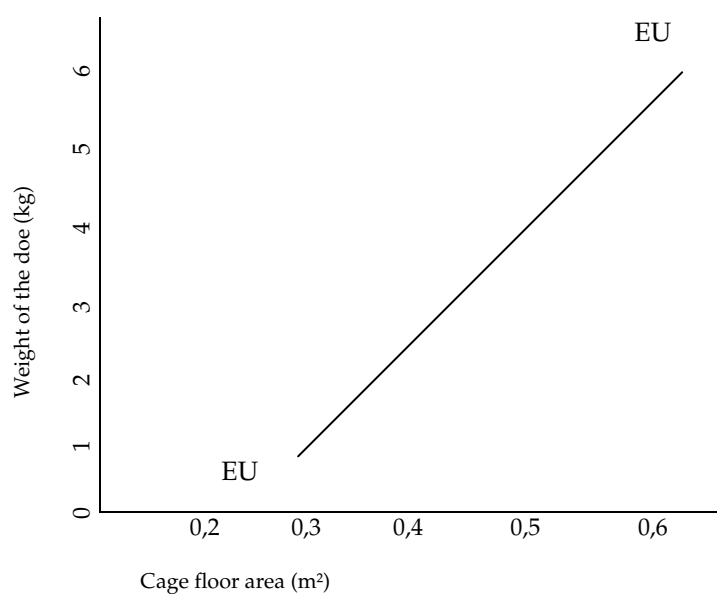


FIGURE 7

Cats (in stock and during procedures)
Minimum cage floor area

Given the weight of a cat, the full-drawn line, EU-EU, gives the minimum area it should be allocated.

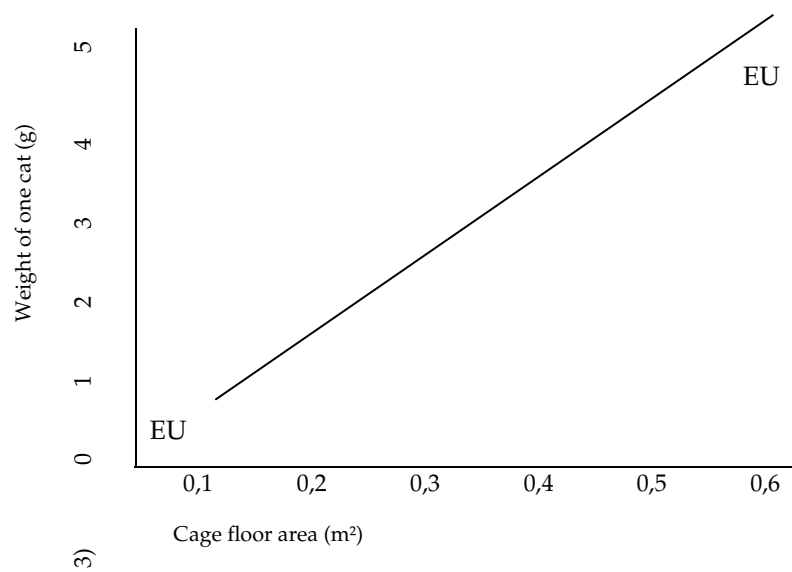


FIGURE 8

*Guide to the relationship between number of mice per cage
and cage floor area (in stock and during procedures)*

The lines represent the average weights and correspond to the line EU-EU in Figure 1

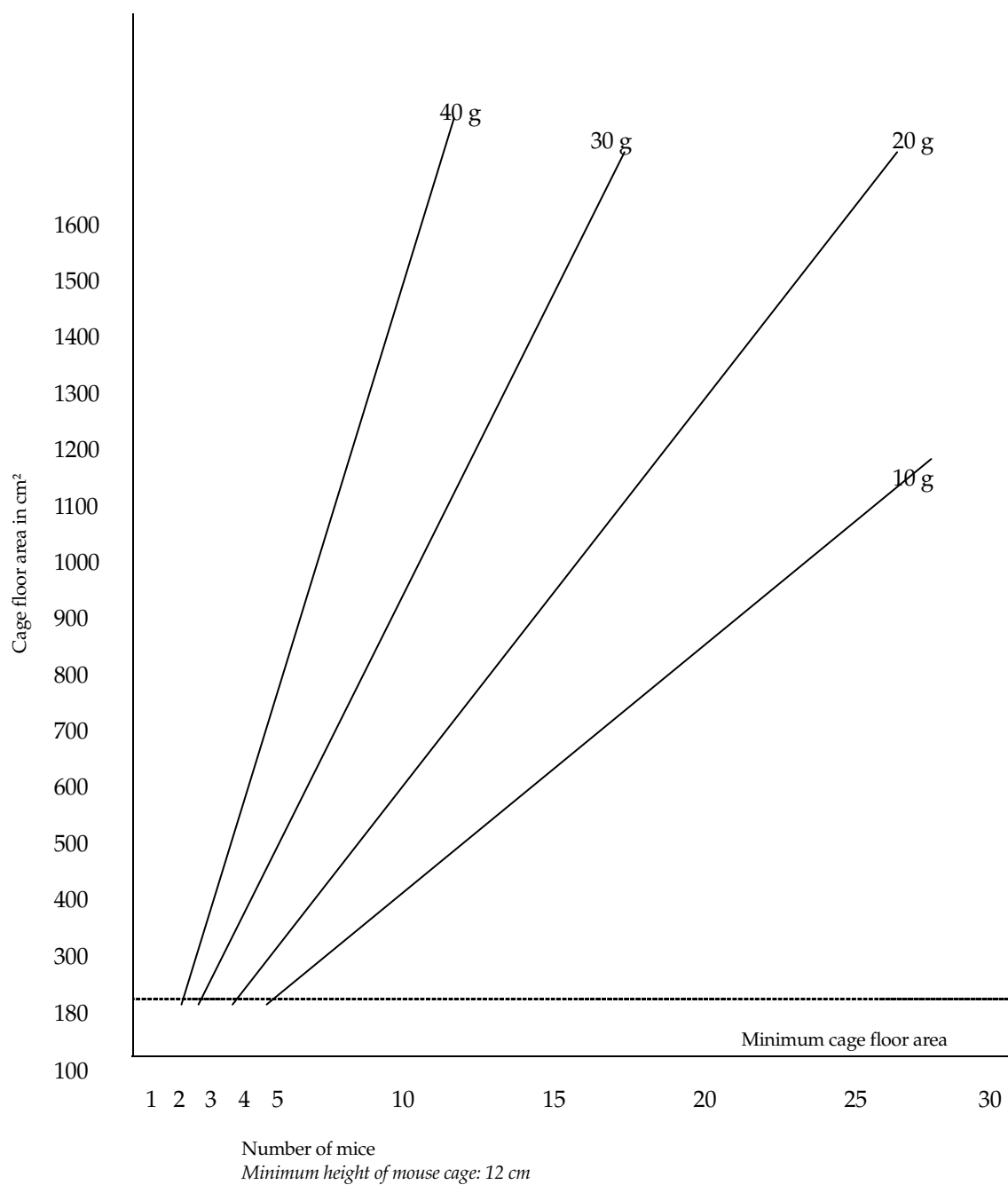


FIGURE 9

*Guide to the relationship between number of rats per cage
and cage floor area (in stock and during procedures)*

The lines represent the average weights and correspond to the line EU-EU in Figure 2

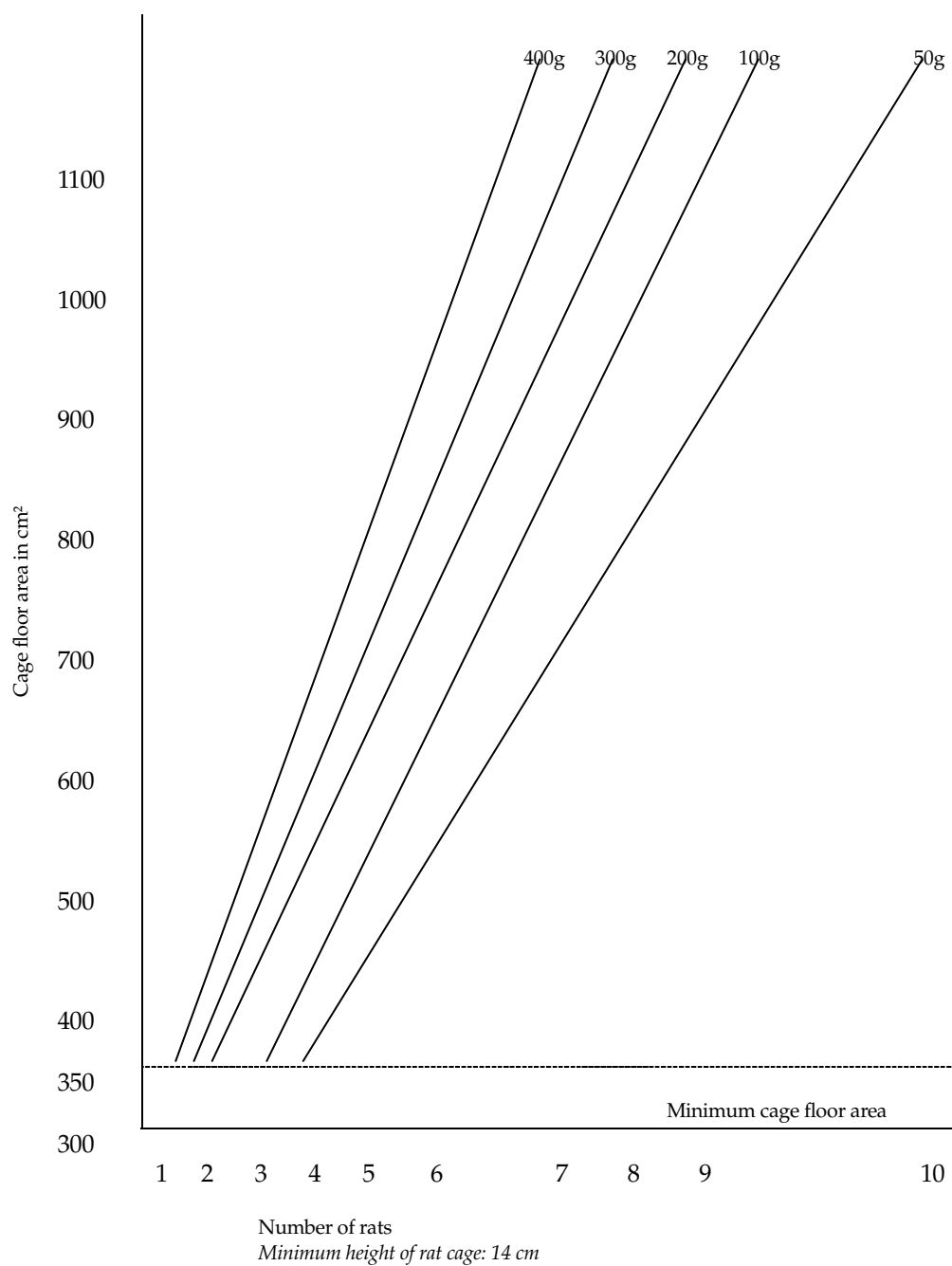


FIGURE 10

*Guide to the relationship between number of hamsters per cage
and cage floor area (in stock and during procedures)*

The lines represent the average weights and correspond to the line EU-EU in Figure 3

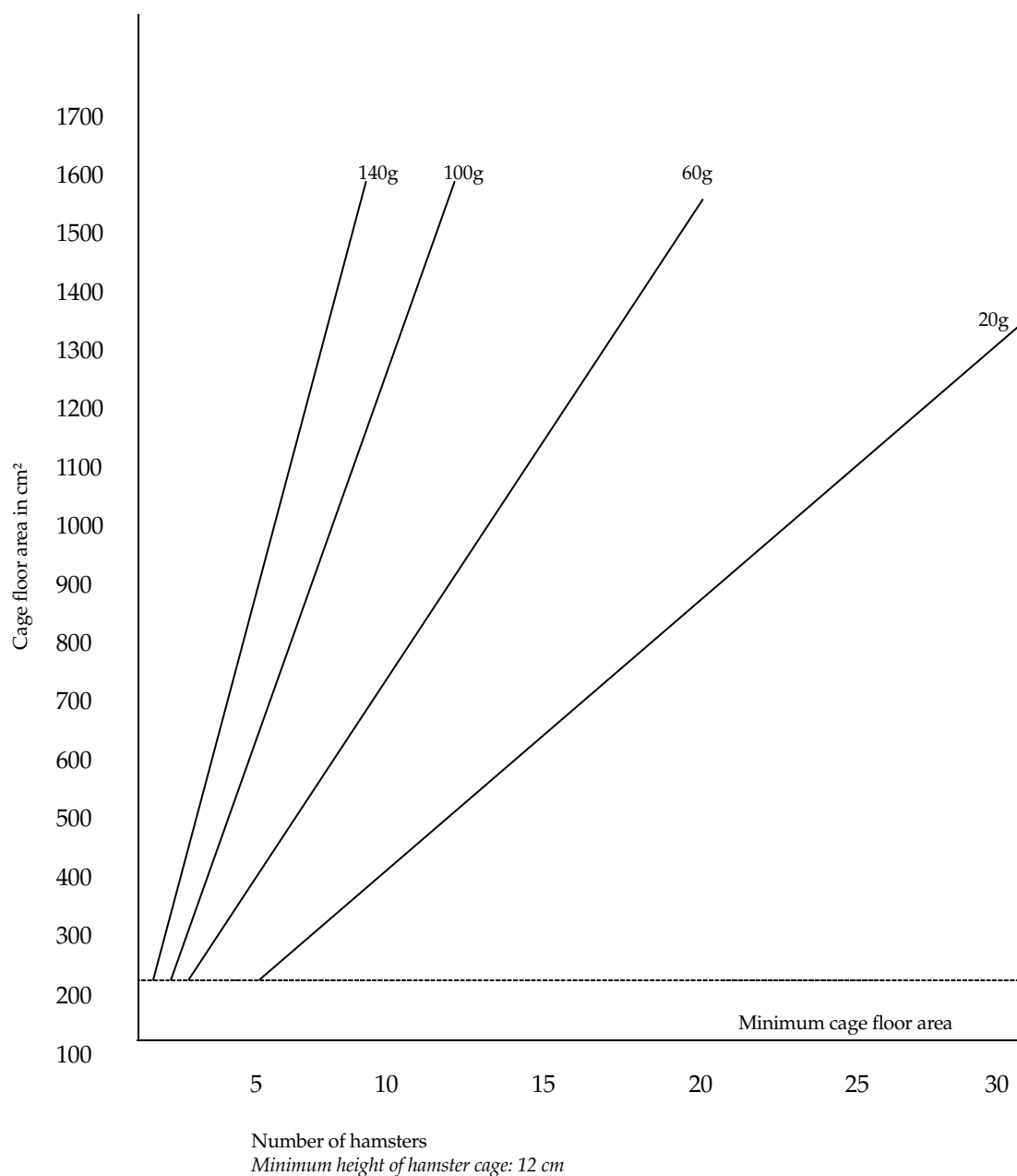


FIGURE 11

*Guide to the relationship between number of guinea pigs per cage
and cage floor area (in stock and during procedures)*

The lines represent the average weights and correspond to the line EU-EU in Figure 4

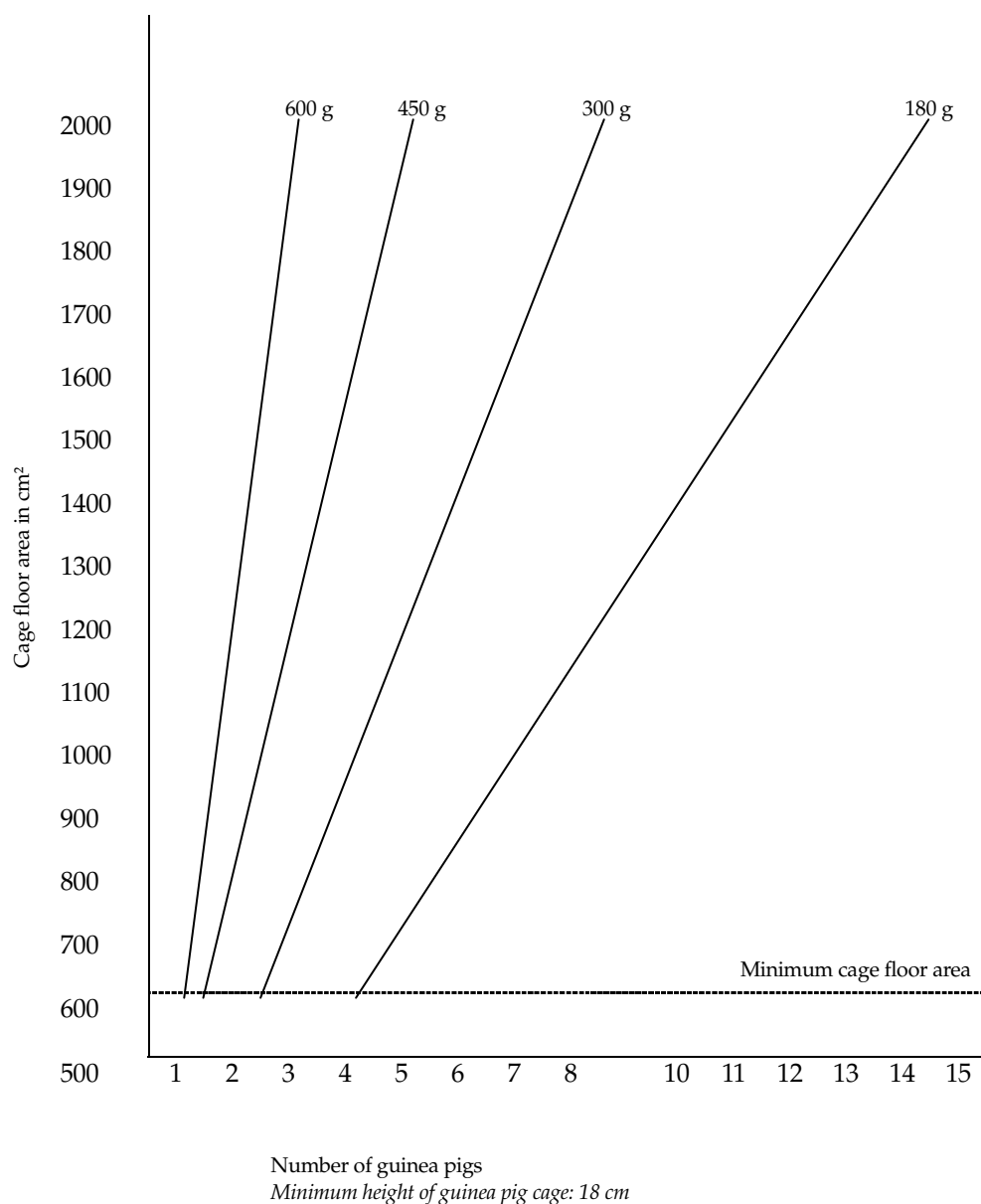
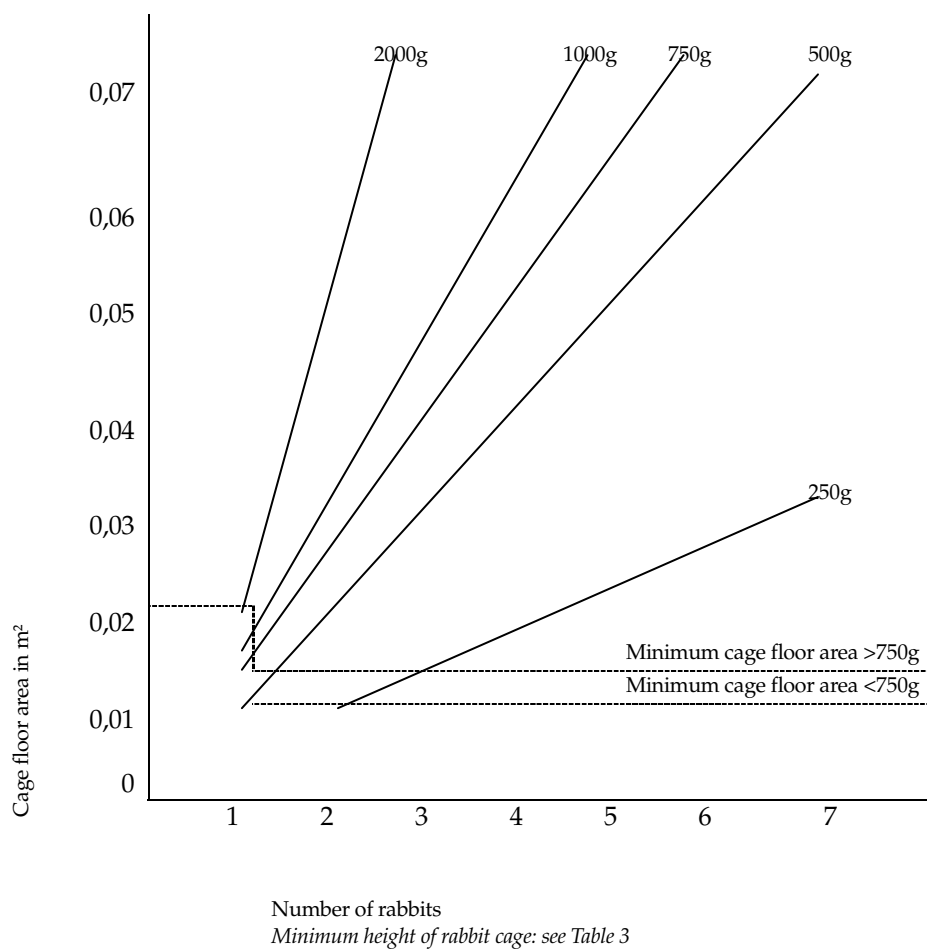


FIGURE 12

*Guide to the relationship between number of rabbits per cage
and cage floor area (in stock and during procedures)*

The lines represent the average weights and correspond to the line EU-EU in Figure 5



APPENDIX B

Statistical tables

and

Explanatory notes for their completion
in fulfilment of the requirements
in Articles 27 and 28
of the Convention

Introduction

Under Article 27 and 28 of the Convention, each Party shall collect statistical information relating to certain aspects of procedures coming under the Convention and communicate this information to the Secretary General of the Council of Europe who shall publish the information received.

The method used to collect the information is for each Party to decide and, of course, any additional statistical information may be collected to satisfy national requirements. However, in order to facilitate the work of the Secretary General, the information supplied to him must be comparable and in accordance with the attached tables. Data shall be collected per calendar year.

General

The animals to be counted are those which will be put to a use which may cause them pain, suffering, distress or lasting harm (see Article 1.2.c of the Convention). The counting shall take place when the animals are put to use in a procedure. Each animal shall be counted once only in the same table. Animals not subject to procedures as defined in Article 1.2.c shall not be counted for the purpose of collecting statistical information in the context of this Convention.

The very nature of biological research makes it inevitable that occasions will arise when it is difficult to decide in which column of a table an animal being used in a procedure should be recorded. There is no right or wrong method of solving the problem, which is one of individual choice. Subject to such directives as the competent authorities may give, it is for the scientist to decide where to record his animal.

It is, however, essential to ensure that no animal is counted twice in the same table.

Table 1

The number and kinds of animals used in procedures

In this table the total number of animals used in procedures shall be given, this total being broken down by types or classes of animal.

Table 2

The number of animals used in procedures for selected purposes

This table is intended to show the number of animals used in the broad areas of: fundamental research, development of new products, safety evaluation, diagnosis of disease, and education and training. In column 1, "medical" includes veterinary medicine.

Table 3

The number of animals used in procedures for selected purposes for the protection of man, animals and the environment by toxicological or other safety evaluations

This table is intended to give a more detailed breakdown of procedures carried out for the general protection of man, animals and the environment excluding medical purposes. Column 6 includes harmful radiation.

Table 4

The number of animals used in procedures concerned with diseases and disorders

This table is intended to illustrate the number of animals used for medical purposes, including veterinary medicine, with special reference to three areas of human disease which are of particular public concern.

Table 5

The number of animals used in procedures required by law

An entry in the column "Party only" shall be made when the procedure is required by the law of the Party in which the procedure takes place, including international obligations into which that Party has entered (for example as a Party to the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia or as a member State of the European Communities).

An entry in the column "Other Parties only" shall be made where the aim of the procedure is specifically to meet requirements, including trade requirements, in countries other than the Party, including also requirements of conventions to which the latter is not a party.

"Both" shall be used where the procedure is intended to meet requirements of both groups; in this case no entry shall be made in either of the other two columns.

TABLE 1

*The number and kinds of animals used in procedures
during (year) in (Party)*

Mice (<i>Mus musculus</i>)	
Rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	
Guinea pigs (<i>Cavia porcellus</i>)	
Other rodents (<i>other Rodentia</i>)	
Rabbits (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	
Apes (<i>Hominoidea</i>)	
Other simians (<i>Cercopithecoidea & Ceboidea</i>)	
Prosimians (<i>Prosimia</i>)	
Dogs (<i>Canis familiaris</i>)	
Cats (<i>Felis catus</i>)	
Other carnivores (<i>other Carnivora</i>)	
Horses, donkeys and cross-breds (<i>Equidae</i>)	
Pigs (<i>Sus</i>)	
Goats and sheep (<i>Capra & Ovis</i>)	
Cattle (<i>Bos</i>)	
Other mammals (<i>other Mammalia</i>)	
Birds (<i>Aves</i>)	
Reptiles (<i>Reptilia</i>)	
Amphibians (<i>Amphibia</i>)	
Fish (<i>Pisces</i>)	
Total	

TABLE 2

*The number of animals used in procedures for selected purposes
during (year) in (Party)*

	All species	Selected species		
		Rodents and rabbits	Dogs and Cats	Primates
1 Biological (including medical) studies of a fundamental nature				
2 Discovery, development and quality control (including safety evaluation) of products or appliances for human and veterinary medicine				
3 Diagnosis of disease				
4 Protection of man, animals and the environment by toxicological or other safety evaluations				
5 Education and training				

TABLE 3

*The number of animals used in procedure for selected purposes
for the protection of man, animals and the environment
by toxicological or other safety evaluations
during (year) in (Party)*

Further classification of Item 4 of Table 2		All species	Selected species		
			Rodents and rabbits	Dogs and Cats	Primates
1	Substances used or intended to be used mainly in agriculture				
2	Substances used or intended to be used mainly in industry				
3	Substances used or intended to be used mainly in households				
4	Substances used or intended to be used mainly as cosmetics or toiletries				
5	Substances used or intended to be used mainly as additives in food for human consumption				
6	Potential or actual hazards of contaminants in the general environment				

TABLE 4

*The number of animals used in procedures concerned with diseases and disorders
during (year) in (Party)*

		All species	Selected species		
			Rodents and rabbits	Dogs and Cats	Primates
	1 Cancer (excluding evaluations of carcinogenic hazards)				
	2 Cardiovascular diseases				
	3 Nervous and mental disorders				
	4 Other human and animal diseases				

Note: When a procedure covers cancer under any item from 2 to 4, the cancer classification should take precedence.

TABLE 5

*The number of animals used in procedures required by law
during (year) in (Party)*

	All species	Selected species		
		Rodents and rabbits	Dogs and Cats	Primates
Party only				
Other Parties only				
Both				

DIRECTIVES

DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

of 22 September 2010

on the protection of animals used for scientific purposes

(Text with EEA relevance)

THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION,

Having regard to the Treaty on the Functioning of the European Union, and in particular Article 114 thereof,

Having regard to the proposal from the European Commission,

Having regard to the opinion of the European Economic and Social Committee ⁽¹⁾,

After consulting the Committee of the Regions,

Acting in accordance with the ordinary legislative procedure ⁽²⁾,

Whereas:

- (1) On 24 November 1986 the Council adopted Directive 86/609/EEC ⁽³⁾ in order to eliminate disparities between laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Since the adoption of that Directive, further disparities between Member States have emerged. Certain Member States have adopted national implementing measures that ensure a high level of protection of animals used for scientific purposes, while others only apply the minimum requirements laid down in Directive 86/609/EEC. These disparities are liable to constitute barriers to trade in products and substances the development of which involves experiments on animals. Accordingly, this Directive should provide for more detailed rules in order to reduce such disparities by approximating the rules applicable in that area and to ensure a proper functioning of the internal market.
- (2) Animal welfare is a value of the Union that is enshrined in Article 13 of the Treaty on the Functioning of the European Union (TFEU).
- (3) On 23 March 1998 the Council adopted Decision 1999/575/EC concerning the conclusion by the Community of the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental

and other scientific purposes ⁽⁴⁾. By becoming party to that Convention, the Community acknowledged the importance of the protection and welfare of animals used for scientific purposes at international level.

- (4) The European Parliament in its resolution of 5 December 2002 on Directive 86/609/EEC called for the Commission to come forward with a proposal for a revision of that Directive with more stringent and transparent measures in the area of animal experimentation.
- (5) On 15 June 2006, the Fourth Multilateral Consultation of Parties to the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes adopted a revised Appendix A to that Convention, which set out guidelines for the accommodation and care of experimental animals. Commission Recommendation 2007/526/EC of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes ⁽⁵⁾ incorporated those guidelines.
- (6) New scientific knowledge is available in respect of factors influencing animal welfare as well as the capacity of animals to sense and express pain, suffering, distress and lasting harm. It is therefore necessary to improve the welfare of animals used in scientific procedures by raising the minimum standards for their protection in line with the latest scientific developments.
- (7) Attitudes towards animals also depend on national perceptions, and there is a demand in certain Member States to maintain more extensive animal-welfare rules than those agreed upon at the level of the Union. In the interests of the animals, and provided it does not affect the functioning of the internal market, it is appropriate to allow the Member States certain flexibility to maintain national rules aimed at more extensive protection of animals in so far as they are compatible with the TFEU.

⁽¹⁾ OJ C 277, 17.11.2009, p. 51.

⁽²⁾ Position of the European Parliament of 5 May 2009 (OJ C 212 E, 5.8.2010, p. 170), position of the Council of 13 September 2010 (not yet published in the Official Journal) and position of the European Parliament of 8 September 2010 (not yet published in the Official Journal).

⁽³⁾ OJ L 358, 18.12.1986, p. 1.

⁽⁴⁾ OJ L 222, 24.8.1999, p. 29.

⁽⁵⁾ OJ L 197, 30.7.2007, p. 1.

- (8) In addition to vertebrate animals including cyclostomes, cephalopods should also be included in the scope of this Directive, as there is scientific evidence of their ability to experience pain, suffering, distress and lasting harm.
- (9) This Directive should also cover foetal forms of mammals, as there is scientific evidence showing that such forms in the last third of the period of their development are at an increased risk of experiencing pain, suffering and distress, which may also affect negatively their subsequent development. Scientific evidence also shows that procedures carried out on embryonic and foetal forms at an earlier stage of development could result in pain, suffering, distress or lasting harm, should the developmental forms be allowed to live beyond the first two thirds of their development.
- (10) While it is desirable to replace the use of live animals in procedures by other methods not entailing the use of live animals, the use of live animals continues to be necessary to protect human and animal health and the environment. However, this Directive represents an important step towards achieving the final goal of full replacement of procedures on live animals for scientific and educational purposes as soon as it is scientifically possible to do so. To that end, it seeks to facilitate and promote the advancement of alternative approaches. It also seeks to ensure a high level of protection for animals that still need to be used in procedures. This Directive should be reviewed regularly in light of evolving science and animal-protection measures.
- (11) The care and use of live animals for scientific purposes is governed by internationally established principles of replacement, reduction and refinement. To ensure that the way in which animals are bred, cared for and used in procedures within the Union is in line with that of the other international and national standards applicable outside the Union, the principles of replacement, reduction and refinement should be considered systematically when implementing this Directive. When choosing methods, the principles of replacement, reduction and refinement should be implemented through a strict hierarchy of the requirement to use alternative methods. Where no alternative method is recognised by the legislation of the Union, the numbers of animals used may be reduced by resorting to other methods and by implementing testing strategies, such as the use of *in vitro* and other methods that would reduce and refine the use of animals.
- (12) Animals have an intrinsic value which must be respected. There are also the ethical concerns of the general public as regards the use of animals in procedures. Therefore, animals should always be treated as sentient creatures and their use in procedures should be restricted to areas which may ultimately benefit human or animal health, or the environment. The use of animals for scientific or educational purposes should therefore only be considered where a non-animal alternative is unavailable. Use of animals for scientific procedures in other areas under the competence of the Union should be prohibited.
- (13) The choice of methods and the species to be used have a direct impact on both the numbers of animals used and their welfare. The choice of methods should therefore ensure the selection of the method that is able to provide the most satisfactory results and is likely to cause the minimum pain, suffering or distress. The methods selected should use the minimum number of animals that would provide reliable results and require the use of species with the lowest capacity to experience pain, suffering, distress or lasting harm that are optimal for extrapolation into target species.
- (14) The methods selected should avoid, as far as possible, death as an end-point due to the severe suffering experienced during the period before death. Where possible, it should be substituted by more humane end-points using clinical signs that determine the impending death, thereby allowing the animal to be killed without any further suffering.
- (15) The use of inappropriate methods for killing an animal can cause significant pain, distress and suffering to the animal. The level of competence of the person carrying out this operation is equally important. Animals should therefore be killed only by a competent person using a method that is appropriate to the species.
- (16) It is necessary to ensure that the use of animals in procedures does not pose a threat to biodiversity. Therefore, the use of endangered species in procedures should be limited to a strict minimum.
- (17) Having regard to the present state of scientific knowledge, the use of non-human primates in scientific procedures is still necessary in biomedical research. Due to their genetic proximity to human beings and to their highly developed social skills, the use of non-human primates in scientific procedures raises specific ethical and practical problems in terms of meeting their behavioural, environmental and social needs in a laboratory environment. Furthermore, the use of non-human primates is of the greatest concern to the public. Therefore the use of non-human primates should be permitted only in those biomedical areas essential for the benefit of human beings, for which no other

alternative replacement methods are yet available. Their use should be permitted only for basic research, the preservation of the respective non-human primate species or when the work, including xenotransplantation, is carried out in relation to potentially life-threatening conditions in humans or in relation to cases having a substantial impact on a person's day-to-day functioning, i.e. debilitating conditions.

- (18) The use of great apes, as the closest species to human beings with the most advanced social and behavioural skills, should be permitted only for the purposes of research aimed at the preservation of those species and where action in relation to a life-threatening, debilitating condition endangering human beings is warranted, and no other species or alternative method would suffice in order to achieve the aims of the procedure. The Member State claiming such a need should provide information necessary for the Commission to take a decision.
- (19) The capture of non-human primates from the wild is highly stressful for the animals concerned and carries an elevated risk of injury and suffering during capture and transport. In order to end the capturing of animals from the wild for breeding purposes, only animals that are the offspring of an animal which has been bred in captivity, or that are sourced from self-sustaining colonies, should be used in procedures after an appropriate transition period. A feasibility study should be carried out to that effect and the transition period adopted if necessary. The feasibility of moving towards sourcing non-human primates only from self-sustaining colonies as an ultimate goal should also be examined.
- (20) There is a need for certain species of vertebrate animals used in procedures to be bred specifically for that purpose so that their genetic, biological and behavioural background is well-known to persons undertaking the procedures. Such knowledge both increases the scientific quality and reliability of the results and decreases the variability, ultimately resulting in fewer procedures and reduced animal use. Furthermore, for reasons of animal welfare and conservation, the use of animals taken from the wild in procedures should be limited to cases where the purpose of the procedures cannot be achieved using animals bred specifically for use in procedures.
- (21) Since the background of stray and feral animals of domestic species is not known, and since capture and placement into establishments increases distress for such animals, they should not, as a general rule, be used in procedures.
- (22) To enhance transparency, facilitate the project authorisation, and provide tools for monitoring compliance, a severity classification of procedures should be introduced on the basis of estimated levels of pain, suffering, distress and lasting harm that is inflicted on the animals.
- (23) From an ethical standpoint, there should be an upper limit of pain, suffering and distress above which animals should not be subjected in scientific procedures. To that end, the performance of procedures that result in severe pain, suffering or distress, which is likely to be long-lasting and cannot be ameliorated, should be prohibited.
- (24) When developing a common format for reporting purposes, the actual severity of the pain, suffering, distress or lasting harm experienced by the animal should be taken into account rather than the predicted severity at the time of the project evaluation.
- (25) The number of animals used in procedures could be reduced by performing procedures on animals more than once, where this does not detract from the scientific objective or result in poor animal welfare. However, the benefit of reusing animals should be balanced against any adverse effects on their welfare, taking into account the lifetime experience of the individual animal. As a result of this potential conflict, the reuse of animals should be considered on a case-by-case basis.
- (26) At the end of the procedure, the most appropriate decision should be taken as regards the future of the animal on the basis of animal welfare and potential risks to the environment. The animals whose welfare would be compromised should be killed. In some cases, animals should be returned to a suitable habitat or husbandry system or animals such as dogs and cats should be allowed to be rehomed in families as there is a high level of public concern as to the fate of such animals. Should Member States allow rehoming, it is essential that the breeder, supplier or user has a scheme in place to provide appropriate socialisation to those animals in order to ensure successful rehoming as well as to avoid unnecessary distress to the animals and to guarantee public safety.
- (27) Animal tissue and organs are used for the development of *in vitro* methods. To promote the principle of reduction, Member States should, where appropriate, facilitate the establishment of programmes for sharing the organs and tissue of animals that are killed.

- (28) The welfare of the animals used in procedures is highly dependent on the quality and professional competence of the personnel supervising procedures, as well as of those performing procedures or supervising those taking care of the animals on a daily basis. Member States should ensure through authorisation or by other means that staff are adequately educated, trained and competent. Furthermore, it is important that staff are supervised until they have obtained and demonstrated the requisite competence. Non-binding guidelines at the level of the Union concerning educational requirements would, in the long run, promote the free movement of personnel.
- (29) The establishments of breeders, suppliers and users should have adequate installations and equipment in place to meet the accommodation requirements of the animal species concerned and to allow the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the animals. The breeders, suppliers and users should operate only if they are authorised by the competent authorities.
- (30) To ensure the ongoing monitoring of animal-welfare needs, appropriate veterinary care should be available at all times and a staff member should be made responsible for the care and welfare of animals in each establishment.
- (31) Animal-welfare considerations should be given the highest priority in the context of animal keeping, breeding and use. Breeders, suppliers and users should therefore have an animal-welfare body in place with the primary task of focusing on giving advice on animal-welfare issues. The body should also follow the development and outcome of projects at establishment level, foster a climate of care and provide tools for the practical application and timely implementation of recent technical and scientific developments in relation to the principles of replacement, reduction and refinement, in order to enhance the life-time experience of the animals. The advice given by the animal-welfare body should be properly documented and open to scrutiny during inspections.
- (32) In order to enable competent authorities to monitor compliance with this Directive, each breeder, supplier and user should maintain accurate records of the numbers of animals, their origins and fate.
- (33) Non-human primates, dogs and cats should have a personal history file from birth covering their lifetimes in order to be able to receive the care, accommodation and treatment that meet their individual needs and characteristics.
- (34) The accommodation and care of animals should be based on the specific needs and characteristics of each species.
- (35) There are differences in the requirements for the accommodation and care of animals between Member States, which contribute to the distortion of the internal market. Furthermore, some of those requirements no longer reflect the most recent knowledge on the impacts of accommodation and care conditions on both the animal welfare and the scientific results of procedures. It is therefore necessary to establish in this Directive harmonised requirements for accommodation and care. These requirements should be updated on the basis of scientific and technical development.
- (36) To monitor compliance with this Directive, Member States should carry out regular inspections of breeders, suppliers and users on a risk basis. To ensure public confidence and promote transparency, an appropriate proportion of the inspections should be carried out without prior warning.
- (37) To assist the Member States in the enforcement of this Directive and on the basis of the findings in the reports on the operation of the national inspections, the Commission should, when there is reason for concern, carry out controls of the national inspection systems. Member States should address any weaknesses identified in the findings of these controls.
- (38) Comprehensive project evaluation, taking into account ethical considerations in the use of animals, forms the core of project authorisation and should ensure the implementation of principles of replacement, reduction and refinement in those projects.
- (39) It is also essential, both on moral and scientific grounds, to ensure that each use of an animal is carefully evaluated as to the scientific or educational validity, usefulness and relevance of the expected result of that use. The likely harm to the animal should be balanced against the expected benefits of the project. Therefore, an impartial project evaluation independent of those involved in the study should be carried out as part of the authorisation process of projects involving the use of live animals. Effective implementation of a project evaluation should also allow for an appropriate assessment of the use of any new scientific experimental techniques as they emerge.
- (40) Due to the nature of the project, the type of species used and the likelihood of achieving the desired objectives of the project, it might be necessary to carry out a retrospective assessment. Since projects may vary significantly in terms of complexity, length, and the time period for obtaining the results, it is necessary that the decision on retrospective assessment should be made taking those aspects fully into account.

- (41) To ensure that the public is informed, it is important that objective information concerning projects using live animals is made publicly available. This should not violate proprietary rights or expose confidential information. Therefore, users should provide anonymous non-technical summaries of those projects, which Member States should publish. The published details should not breach the anonymity of the users.
- (42) To manage risks to human and animal health and the environment, the legislation of the Union provides that substances and products can be marketed only after appropriate safety and efficacy data have been submitted. Some of those requirements can be fulfilled only by resorting to animal testing, hereinafter referred to as 'regulatory testing'. It is necessary to introduce specific measures in order to increase the use of alternative approaches and to eliminate unnecessary duplication of regulatory testing. For that purpose Member States should recognise the validity of test data produced using test methods provided for under the legislation of the Union.
- (43) To reduce the administrative workload and enhance the competitiveness of research and industry in the Union, it should be possible to authorise multiple generic projects when carried out using established methods for testing, diagnostic or production purposes under one group authorisation, albeit without exempting any of these procedures from the project evaluation.
- (44) To ensure effective examination of authorisation applications and to enhance the competitiveness of research and industry in the Union, a time-limit should be set for the competent authorities to evaluate project proposals and take decisions on the authorisation of such projects. In order not to compromise the quality of the project evaluation, additional time might be required for more complex project proposals due to the number of disciplines involved, the novel characteristics and more complex techniques of the proposed project. However, the extension of deadlines for project evaluation should remain the exception.
- (45) Given the routine or repetitive nature of certain procedures, it is appropriate to provide for a regulatory option whereby the Member States could introduce a simplified administrative procedure for the evaluation of projects containing such procedures, provided certain requirements laid down in this Directive are complied with.
- (46) The availability of alternative methods is highly dependent on the progress of the research into the development of alternatives. The Community Framework Programmes for Research and Technological Development provided increasing funding for projects which aim to replace, reduce and refine the use of animals in procedures. In order to increase competitiveness of research and industry in the Union and to replace, reduce and refine the use of animals in procedures, the Commission and the Member States should contribute through research and by other means to the development and validation of alternative approaches.
- (47) The European Centre for the Validation of Alternative Methods, a policy action within the Joint Research Centre of the Commission, has coordinated the validation of alternative approaches in the Union since 1991. However, there is an increasing need for new methods to be developed and proposed for validation, which requires a reference laboratory of the Union for the validation of alternative methods to be established formally. This laboratory should be referred to as the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). It is necessary for the Commission to cooperate with the Member States when setting priorities for validation studies. The Member States should assist the Commission in identifying and nominating suitable laboratories to carry out such validation studies. For validation studies that are similar to previously validated methods and in respect of which a validation represents a significant competitive advantage, ECVAM should be able to collect charges from those who submit their methods for validation. Such charges should not be prohibitive of healthy competition in the testing industry.
- (48) There is a need to ensure a coherent approach to project evaluation and review strategies at national level. Member States should establish national committees for the protection of animals used for scientific purposes to give advice to the competent authorities and animal-welfare bodies in order to promote the principles of replacement, reduction and refinement. A network of national committees should play a role in the exchange of best practice at the level of the Union.
- (49) Technical and scientific advancements in biomedical research can be rapid, as can the increase in knowledge of factors influencing animal welfare. It is therefore necessary to provide for a review of this Directive. Such review should examine the possible replacement of the use of animals, and in particular non-human primates, as a matter of priority where it is possible, taking into account the advancement of science. The Commission should also conduct periodic thematic reviews concerning the replacement, reduction and refinement of the use of animals in procedures.

- (50) In order to ensure uniform conditions for implementation, implementing powers should be conferred on the Commission to adopt guidelines at the level of the Union on the requirements with regard to education, training and competence of breeders', suppliers' and users' staff, to adopt detailed rules regarding the Union Reference Laboratory, its duties and tasks and the charges it may collect, to establish a common format for submitting the information by Member States to the Commission on the implementation of this Directive, statistical information and other specific information, and for the application of safeguard clauses. According to Article 291 TFEU, rules and general principles concerning mechanisms for the control by Member States of the Commission's exercise of implementing powers shall be laid down in advance by a regulation adopted in accordance with the ordinary legislative procedure. Pending the adoption of that new regulation, Council Decision 1999/468/EC of 28 June 1999 laying down the procedures for the exercise of implementing powers conferred on the Commission⁽¹⁾ continues to apply, with the exception of the regulatory procedure with scrutiny, which is not applicable.
- (51) The Commission should be empowered to adopt delegated acts in accordance with Article 290 TFEU in respect of the following: modifications of the list of species falling under the obligation of being specifically bred for use in procedures; modifications of the care and accommodation standards; modifications of methods of killing, including their specifications; modifications of the elements to be used for the establishment by Member States of requirements with regard to education, training and competence of breeders', suppliers' and users' personnel; modifications of certain obligatory elements of the application for authorisation; modifications regarding the Union Reference Laboratory, its duties and tasks; as well as modifications of examples of different types of procedures assigned to each of the severity categories on the basis of factors related to the type of procedure. It is of particular importance that the Commission carry out appropriate consultation during its preparatory work, including at expert level.
- (52) Member States should lay down rules on penalties applicable to infringements of the provisions of this Directive and ensure that they are implemented. Those penalties should be effective, proportionate and dissuasive.
- (53) Directive 86/609/EEC should therefore be repealed. Certain modifications introduced by this Directive have a direct impact on the application of Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption⁽²⁾. It is therefore appropriate to amend a provision of that Regulation accordingly.
- (54) Benefits to animal welfare from applying project authorisation retrospectively, and the related administrative costs, can only be justified for long term ongoing projects. Therefore, it is necessary to include transitional measures for ongoing short and medium term projects to avoid the need for retrospective authorisation with only limited benefits.
- (55) In accordance with paragraph 34 of the Interinstitutional Agreement on better law-making, Member States are encouraged to draw up, for themselves and in the interests of the Union, their own tables, which will, as far as possible, illustrate the correlation between this Directive and the transposition measures, and to make them public.
- (56) Since the objective of this Directive, namely the harmonisation of legislation concerning the use of animals for scientific purposes, cannot be sufficiently achieved by the Member States and can therefore, by reason of its scale and effects, be better achieved at Union level, the Union may adopt measures, in accordance with the principle of subsidiarity as set out in Article 5 of the Treaty on European Union. In accordance with the principle of proportionality, as set out in that Article, this Directive does not go beyond what is necessary in order to achieve that objective.

HAVE ADOPTED THIS DIRECTIVE:

CHAPTER I

GENERAL PROVISIONS

Article 1

Subject matter and scope

1. This Directive establishes measures for the protection of animals used for scientific or educational purposes.

To that end, it lays down rules on the following:

- (a) the replacement and reduction of the use of animals in procedures and the refinement of the breeding, accommodation, care and use of animals in procedures;
- (b) the origin, breeding, marking, care and accommodation and killing of animals;
- (c) the operations of breeders, suppliers and users;
- (d) the evaluation and authorisation of projects involving the use of animals in procedures.

2. This Directive shall apply where animals are used or intended to be used in procedures, or bred specifically so that their organs or tissues may be used for scientific purposes.

This Directive shall apply until the animals referred to in the first subparagraph have been killed, rehomed or returned to a suitable habitat or husbandry system.

⁽¹⁾ OJ L 184, 17.7.1999, p. 23.

⁽²⁾ OJ L 300, 14.11.2009, p. 1.

The elimination of pain, suffering, distress or lasting harm by the successful use of anaesthesia, analgesia or other methods shall not exclude the use of an animal in procedures from the scope of this Directive.

3. This Directive shall apply to the following animals:

(a) live non-human vertebrate animals, including:

- (i) independently feeding larval forms; and
- (ii) foetal forms of mammals as from the last third of their normal development;

(b) live cephalopods.

4. This Directive shall apply to animals used in procedures, which are at an earlier stage of development than that referred to in point (a) of paragraph 3, if the animal is to be allowed to live beyond that stage of development and, as a result of the procedures performed, is likely to experience pain, suffering, distress or lasting harm after it has reached that stage of development.

5. This Directive shall not apply to the following:

- (a) non-experimental agricultural practices;
- (b) non-experimental clinical veterinary practices;
- (c) veterinary clinical trials required for the marketing authorisation of a veterinary medicinal product;
- (d) practices undertaken for the purposes of recognised animal husbandry;
- (e) practices undertaken for the primary purpose of identification of an animal;
- (f) practices not likely to cause pain, suffering, distress or lasting harm equivalent to, or higher than, that caused by the introduction of a needle in accordance with good veterinary practice.

6. This Directive shall apply without prejudice to Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products ⁽¹⁾.

Article 2

Stricter national measures

1. Member States may, while observing the general rules laid down in the TFEU, maintain provisions in force on 9 November 2010, aimed at ensuring more extensive protection of animals falling within the scope of this Directive than those contained in this Directive.

Before 1 January 2013 Member States shall inform the Commission about such national provisions. The Commission shall bring them to the attention of other Member States.

⁽¹⁾ OJ L 262, 27.9.1976, p. 169. Directive recast by Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (OJ L 342, 22.12.2009, p. 59), which applies as from 11 July 2013.

2. When acting pursuant to paragraph 1, a Member State shall not prohibit or impede the supply or use of animals bred or kept in another Member State in accordance with this Directive, nor shall it prohibit or impede the placing on the market of products developed with the use of such animals in accordance with this Directive.

Article 3

Definitions

For the purposes of this Directive the following definitions shall apply:

1. 'procedure' means any use, invasive or non-invasive, of an animal for experimental or other scientific purposes, with known or unknown outcome, or educational purposes, which may cause the animal a level of pain, suffering, distress or lasting harm equivalent to, or higher than, that caused by the introduction of a needle in accordance with good veterinary practice.

This includes any course of action intended, or liable, to result in the birth or hatching of an animal or the creation and maintenance of a genetically modified animal line in any such condition, but excludes the killing of animals solely for the use of their organs or tissues;

2. 'project' means a programme of work having a defined scientific objective and involving one or more procedures;

3. 'establishment' means any installation, building, group of buildings or other premises and may include a place that is not wholly enclosed or covered and mobile facilities;

4. 'breeder' means any natural or legal person breeding animals referred to in Annex I with a view to their use in procedures or for the use of their tissue or organs for scientific purposes, or breeding other animals primarily for those purposes, whether for profit or not;

5. 'supplier' means any natural or legal person, other than a breeder, supplying animals with a view to their use in procedures or for the use of their tissue or organs for scientific purposes, whether for profit or not;

6. 'user' means any natural or legal person using animals in procedures, whether for profit or not;

7. 'competent authority' means an authority or authorities or bodies designated by a Member State to carry out the obligations arising from this Directive.

Article 4

Principle of replacement, reduction and refinement

1. Member States shall ensure that, wherever possible, a scientifically satisfactory method or testing strategy, not entailing the use of live animals, shall be used instead of a procedure.

2. Member States shall ensure that the number of animals used in projects is reduced to a minimum without compromising the objectives of the project.

3. Member States shall ensure refinement of breeding, accommodation and care, and of methods used in procedures, eliminating or reducing to the minimum any possible pain, suffering, distress or lasting harm to the animals.

4. This Article shall, in the choice of methods, be implemented in accordance with Article 13.

Article 5

Purposes of procedures

Procedures may be carried out for the following purposes only:

- (a) basic research;
- (b) translational or applied research with any of the following aims:
 - (i) the avoidance, prevention, diagnosis or treatment of disease, ill-health or other abnormality or their effects in human beings, animals or plants;
 - (ii) the assessment, detection, regulation or modification of physiological conditions in human beings, animals or plants; or
 - (iii) the welfare of animals and the improvement of the production conditions for animals reared for agricultural purposes;
- (c) for any of the aims in point (b) in the development, manufacture or testing of the quality, effectiveness and safety of drugs, foodstuffs and feed-stuffs and other substances or products;
- (d) protection of the natural environment in the interests of the health or welfare of human beings or animals;
- (e) research aimed at preservation of the species;
- (f) higher education, or training for the acquisition, maintenance or improvement of vocational skills;
- (g) forensic inquiries.

Article 6

Methods of killing

1. Member States shall ensure that animals are killed with minimum pain, suffering and distress.

2. Member States shall ensure that animals are killed in the establishment of a breeder, supplier or user, by a competent person.

However, in the case of a field study an animal may be killed by a competent person outside of an establishment.

3. In relation to the animals covered by Annex IV, the appropriate method of killing as set out in that Annex shall be used.

4. Competent authorities may grant exemptions from the requirement in paragraph 3:

- (a) to allow the use of another method provided that, on the basis of scientific evidence, the method is considered to be at least as humane; or
- (b) when, on the basis of scientific justification, the purpose of the procedure cannot be achieved by the use of a method of killing set out in Annex IV.

5. Paragraphs 2 and 3 shall not apply where an animal has to be killed in emergency circumstances for animal-welfare, public-health, public-security, animal-health or environmental reasons.

CHAPTER II

PROVISIONS ON THE USE OF CERTAIN ANIMALS IN PROCEDURES

Article 7

Endangered species

1. Specimens of those endangered species listed in Annex A to Council Regulation (EC) No 338/97 of 9 December 1996 on the protection of species of wild fauna and flora by regulating trade therein⁽¹⁾, which do not fall within the scope of Article 7(1) of that Regulation, shall not be used in procedures, with the exception of those procedures meeting the following conditions:

- (a) the procedure has one of the purposes referred to in points (b)(i), (c) or (e) of Article 5 of this Directive; and
- (b) there is scientific justification to the effect that the purpose of the procedure cannot be achieved by the use of species other than those listed in that Annex.

2. Paragraph 1 shall not apply to any species of non-human primates.

Article 8

Non-human primates

1. Subject to paragraph 2, specimens of non-human primates shall not be used in procedures, with the exception of those procedures meeting the following conditions:

- (a) the procedure has one of the purposes referred to in
 - (i) points (b)(i) or (c) of Article 5 of this Directive and is undertaken with a view to the avoidance, prevention, diagnosis or treatment of debilitating or potentially life-threatening clinical conditions in human beings; or
 - (ii) points (a) or (e) of Article 5;

and

- (b) there is scientific justification to the effect that the purpose of the procedure cannot be achieved by the use of species other than non-human primates.

⁽¹⁾ OJ L 61, 3.3.1997, p. 1.

A debilitating clinical condition for the purposes of this Directive means a reduction in a person's normal physical or psychological ability to function.

2. Specimens of non-human primates listed in Annex A to Regulation (EC) No 338/97, which do not fall within the scope of Article 7(1) of that Regulation, shall not be used in procedures, with the exception of those procedures meeting the following conditions:

- (a) the procedure has one of the purposes referred to in:
 - (i) points (b)(i) or (c) of Article 5 of this Directive and is undertaken with a view to the avoidance, prevention, diagnosis or treatment of debilitating or potentially life-threatening clinical conditions in human beings; or
 - (ii) Article 5(e);

and

- (b) there is scientific justification to the effect that the purpose of the procedure cannot be achieved by the use of species other than non-human primates and by the use of species not listed in that Annex.

3. Notwithstanding paragraphs 1 and 2, great apes shall not be used in procedures, subject to the use of the safeguard clause in Article 55(2).

Article 9

Animals taken from the wild

1. Animals taken from the wild shall not be used in procedures.
2. Competent authorities may grant exemptions from paragraph 1 on the basis of scientific justification to the effect that the purpose of the procedure cannot be achieved by the use of an animal which has been bred for use in procedures.
3. The capture of animals in the wild shall be carried out only by competent persons using methods which do not cause the animals avoidable pain, suffering, distress or lasting harm.

Any animal found, at or after capture, to be injured or in poor health shall be examined by a veterinarian or another competent person and action shall be taken to minimise the suffering of the animal. Competent authorities may grant exemptions from the requirement of taking action to minimise the suffering of the animal if there is scientific justification.

Article 10

Animals bred for use in procedures

1. Member States shall ensure that animals belonging to the species listed in Annex I may only be used in procedures where those animals have been bred for use in procedures.

However, from the dates set out in Annex II, Member States shall ensure that non-human primates listed therein may be used in procedures only where they are the offspring of non-human primates which have been bred in captivity or where they are sourced from self-sustaining colonies.

For the purposes of this Article a 'self-sustaining colony' means a colony in which animals are bred only within the colony or sourced from other colonies but not taken from the wild, and where the animals are kept in a way that ensures that they are accustomed to humans.

The Commission shall, in consultation with the Member States and stakeholders, conduct a feasibility study, which shall include an animal health and welfare assessment, of the requirement laid down in the second subparagraph. The study shall be published no later than 10 November 2017. It shall be accompanied, where appropriate, by proposals for amendments to Annex II.

2. The Commission shall keep under review the use of sourcing non-human primates from self-sustaining colonies and, in consultation with the Member States and stakeholders, conduct a study to analyse the feasibility of sourcing animals only from self-sustaining colonies.

The study shall be published no later than 10 November 2022.

3. Competent authorities may grant exemptions from paragraph 1 on the basis of scientific justification.

Article 11

Stray and feral animals of domestic species

1. Stray and feral animals of domestic species shall not be used in procedures.
2. The competent authorities may only grant exemptions from paragraph 1 subject to the following conditions:
 - (a) there is an essential need for studies concerning the health and welfare of the animals or serious threats to the environment or to human or animal health; and
 - (b) there is scientific justification to the effect that the purpose of the procedure can be achieved only by the use of a stray or a feral animal.

CHAPTER III

PROCEDURES

Article 12

Procedures

1. Member States shall ensure that procedures are carried out in a user's establishment.

The competent authority may grant an exemption from the first subparagraph on the basis of scientific justification.

2. Procedures may be carried out only within the framework of a project.

Article 13

Choice of methods

1. Without prejudice to national legislation prohibiting certain types of methods, Member States shall ensure that a procedure is not carried out if another method or testing strategy for obtaining the result sought, not entailing the use of a live animal, is recognised under the legislation of the Union.

2. In choosing between procedures, those which to the greatest extent meet the following requirements shall be selected:

- (a) use the minimum number of animals;
- (b) involve animals with the lowest capacity to experience pain, suffering, distress or lasting harm;
- (c) cause the least pain, suffering, distress or lasting harm;

and are most likely to provide satisfactory results.

3. Death as the end-point of a procedure shall be avoided as far as possible and replaced by early and humane end-points. Where death as the end-point is unavoidable, the procedure shall be designed so as to:

- (a) result in the deaths of as few animals as possible; and
- (b) reduce the duration and intensity of suffering to the animal to the minimum possible and, as far as possible, ensure a painless death.

Article 14

Anaesthesia

1. Member States shall ensure that, unless it is inappropriate, procedures are carried out under general or local anaesthesia, and that analgesia or another appropriate method is used to ensure that pain, suffering and distress are kept to a minimum.

Procedures that involve serious injuries that may cause severe pain shall not be carried out without anaesthesia.

2. When deciding on the appropriateness of using anaesthesia, the following shall be taken into account:

- (a) whether anaesthesia is judged to be more traumatic to the animal than the procedure itself; and
- (b) whether anaesthesia is incompatible with the purpose of the procedure.

3. Member States shall ensure that animals are not given any drug to stop or restrict their showing pain without an adequate level of anaesthesia or analgesia.

In these cases, a scientific justification shall be provided, accompanied by the details of the anaesthetic or analgesic regimen.

4. An animal, which may suffer pain once anaesthesia has worn off, shall be treated with pre-emptive and post-operative analgesics or other appropriate pain-relieving methods provided that it is compatible with the purpose of the procedure.

5. As soon as the purpose of the procedure has been achieved appropriate action shall be taken to minimise the suffering of the animal.

Article 15

Classification of severity of procedures

1. Member States shall ensure that all procedures are classified as 'non-recovery', 'mild', 'moderate', or 'severe' on a case-by-case basis using the assignment criteria set out in Annex VIII.

2. Subject to the use of the safeguard clause in Article 55(3), Member States shall ensure that a procedure is not performed if it involves severe pain, suffering or distress that is likely to be long-lasting and cannot be ameliorated.

Article 16

Reuse

1. Member States shall ensure that an animal already used in one or more procedures, when a different animal on which no procedure has previously been carried out could also be used, may only be reused in a new procedure provided that the following conditions are met:

- (a) the actual severity of the previous procedures was 'mild' or 'moderate';
- (b) it is demonstrated that the animal's general state of health and well-being has been fully restored;
- (c) the further procedure is classified as 'mild', 'moderate' or 'non-recovery'; and
- (d) it is in accordance with veterinary advice, taking into account the lifetime experience of the animal.

2. In exceptional circumstances, by way of derogation from point (a) of paragraph 1 and after a veterinary examination of the animal, the competent authority may allow reuse of an animal, provided the animal has not been used more than once in a procedure entailing severe pain, distress or equivalent suffering.

Article 17

End of the procedure

1. A procedure shall be deemed to end when no further observations are to be made for that procedure or, as regards new genetically modified animal lines, when the progeny are no longer observed or expected to experience pain, suffering, distress or lasting harm equivalent to, or higher than, that caused by the introduction of a needle.

2. At the end of a procedure, a decision to keep an animal alive shall be taken by a veterinarian or by another competent person. An animal shall be killed when it is likely to remain in moderate or severe pain, suffering, distress or lasting harm.

3. Where an animal is to be kept alive, it shall receive care and accommodation appropriate to its state of health.

Article 18

Sharing organs and tissues

Member States shall facilitate, where appropriate, the establishment of programmes for the sharing of organs and tissues of animals killed.

Article 19

Setting free of animals and rehoming

Member States may allow animals used or intended to be used in procedures to be rehomed, or returned to a suitable habitat or husbandry system appropriate to the species, provided that the following conditions are met:

- (a) the state of health of the animal allows it;
- (b) there is no danger to public health, animal health or the environment; and
- (c) appropriate measures have been taken to safeguard the well-being of the animal.

CHAPTER IV

AUTHORISATION

Section 1

Requirements for breeders, suppliers and users

Article 20

Authorisation of breeders, suppliers and users

1. Member States shall ensure that all breeders, suppliers and users are authorised by, and registered with, the competent authority. Such authorisation may be granted for a limited period.

Authorisation shall be granted only if the breeder, supplier or user and its establishment is in compliance with the requirements of this Directive.

2. The authorisation shall specify the person responsible for ensuring compliance with the provisions of this Directive and the person or persons referred to in Article 24(1) and in Article 25.

3. Renewal of the authorisation shall be required for any significant change to the structure or the function of an establishment of a breeder, supplier or user that could negatively affect animal welfare.

4. Member States shall ensure that the competent authority is notified of any changes of the person or persons referred to in paragraph 2.

Article 21

Suspension and withdrawal of authorisation

1. Where a breeder, supplier or user no longer complies with the requirements set out in this Directive, the competent authority shall take appropriate remedial action, or require such action to be taken, or suspend or withdraw its authorisation.

2. Member States shall ensure that, where the authorisation is suspended or withdrawn, the welfare of the animals housed in the establishment is not adversely affected.

Article 22

Requirements for installations and equipment

1. Member States shall ensure that all establishments of a breeder, supplier or user have installations and equipment suited to the species of animals housed and, where procedures are carried out, to the performance of the procedures.

2. The design, construction and method of functioning of the installations and equipment referred to in paragraph 1 shall ensure that the procedures are carried out as effectively as possible, and aim at obtaining reliable results using the minimum number of animals and causing the minimum degree of pain, suffering, distress or lasting harm.

3. For the purposes of implementation of paragraphs 1 and 2, Member States shall ensure that the relevant requirements as set out in Annex III are complied with.

Article 23

Competence of personnel

1. Member States shall ensure that each breeder, supplier and user has sufficient staff on site.

2. The staff shall be adequately educated and trained before they perform any of the following functions:

- (a) carrying out procedures on animals;
- (b) designing procedures and projects;
- (c) taking care of animals; or
- (d) killing animals.

Persons carrying out the functions referred to in point (b) shall have received instruction in a scientific discipline relevant to the work being undertaken and shall have species-specific knowledge.

Staff carrying out functions referred to in points (a), (c) or (d) shall be supervised in the performance of their tasks until they have demonstrated the requisite competence.

Member States shall ensure, through authorisation or by other means, that the requirements laid down in this paragraph are fulfilled.

3. Member States shall publish, on the basis of the elements set out in Annex V, minimum requirements with regard to education and training and the requirements for obtaining, maintaining and demonstrating requisite competence for the functions set out in paragraph 2.

4. Non-binding guidelines at the level of the Union on the requirements laid down in paragraph 2 may be adopted in accordance with the advisory procedure referred to in Article 56(2).

Article 24

Specific requirements for personnel

1. Member States shall ensure that each breeder, supplier and user has one or several persons on site who shall:

- (a) be responsible for overseeing the welfare and care of the animals in the establishment;
- (b) ensure that the staff dealing with animals have access to information specific to the species housed in the establishment;
- (c) be responsible for ensuring that the staff are adequately educated, competent and continuously trained and that they are supervised until they have demonstrated the requisite competence.

2. Member States shall ensure that persons specified in Article 40(2)(b) shall:

- (a) ensure that any unnecessary pain, suffering, distress or lasting harm that is being inflicted on an animal in the course of a procedure is stopped; and
- (b) ensure that the projects are carried out in accordance with the project authorisation or, in the cases referred to in Article 42, in accordance with the application sent to the competent authority or any decision taken by the competent authority, and ensure that in the event of non-compliance, the appropriate measures to rectify it are taken and recorded.

Article 25

Designated veterinarian

Member States shall ensure that each breeder, supplier and user has a designated veterinarian with expertise in laboratory animal medicine, or a suitably qualified expert where more appropriate, charged with advisory duties in relation to the well-being and treatment of the animals.

Article 26

Animal-welfare body

1. Member States shall ensure that each breeder, supplier and user sets up an animal-welfare body.

2. The animal-welfare body shall include at least the person or persons responsible for the welfare and care of the animals

and, in the case of a user, a scientific member. The animal-welfare body shall also receive input from the designated veterinarian or the expert referred to in Article 25.

3. Member States may allow small breeders, suppliers and users to fulfil the tasks laid down in Article 27(1) by other means.

Article 27

Tasks of the animal-welfare body

1. The animal-welfare body shall, as a minimum, carry out the following tasks:

- (a) advise the staff dealing with animals on matters related to the welfare of animals, in relation to their acquisition, accommodation, care and use;
- (b) advise the staff on the application of the requirement of replacement, reduction and refinement, and keep it informed of technical and scientific developments concerning the application of that requirement;
- (c) establish and review internal operational processes as regards monitoring, reporting and follow-up in relation to the welfare of animals housed or used in the establishment;
- (d) follow the development and outcome of projects, taking into account the effect on the animals used, and identify and advise as regards elements that further contribute to replacement, reduction and refinement; and
- (e) advise on rehoming schemes, including the appropriate socialisation of the animals to be rehomed.

2. Member States shall ensure that the records of any advice given by the animal-welfare body and decisions taken regarding that advice are kept for at least 3 years.

The records shall be made available to the competent authority upon request.

Article 28

Breeding strategy for non-human primates

Member States shall ensure that breeders of non-human primates have a strategy in place for increasing the proportion of animals that are the offspring of non-human primates that have been bred in captivity.

Article 29

Scheme for rehoming or setting free of animals

Where Member States allow rehoming, the breeders, suppliers and users from which animals are intended to be rehomed shall have a rehoming scheme in place that ensures socialisation of the animals that are rehomed. In the case of wild animals, where appropriate, a programme of rehabilitation shall be in place before they are returned to their habitat.

*Article 30***Animal records**

1. Member States shall ensure that all breeders, suppliers and users keep records of at least the following:

- (a) the number and the species of animals bred, acquired, supplied, used in procedures, set-free or rehomed;
- (b) the origin of the animals, including whether they are bred for use in procedures;
- (c) the dates on which the animals are acquired, supplied, released or rehomed;
- (d) from whom the animals are acquired;
- (e) the name and address of the recipient of animals;
- (f) the number and species of animals which died or were killed in each establishment. For animals that have died, the cause of death shall, when known, be noted; and
- (g) in the case of users, the projects in which animals are used.

2. The records referred to in paragraph 1 shall be kept for a minimum of 5 years and made available to the competent authority upon request.

*Article 31***Information on dogs, cats and non-human primates**

1. Member States shall ensure that all breeders, suppliers and users keep the following information on each dog, cat and non-human primate:

- (a) identity;
- (b) place and date of birth, when available;
- (c) whether it is bred for use in procedures; and
- (d) in the case of a non-human primate, whether it is the offspring of non-human primates that have been bred in captivity.

2. Each dog, cat and non-human primate shall have an individual history file, which follows the animal as long as it is kept for the purposes of this Directive.

The file shall be established at birth or as soon as possible thereafter and shall cover any relevant reproductive, veterinary and social information on the individual animal and the projects in which it has been used.

3. The information referred to in this Article shall be kept for a minimum of 3 years after the death or rehoming of the

animal and shall be made available to the competent authority upon request.

In the case of rehoming, relevant veterinary care and social information from the individual history file referred to in paragraph 2 shall accompany the animal.

*Article 32***Marking and identification of dogs, cats and non-human primates**

1. Each dog, cat or non-human primate shall be provided, at the latest at the time of weaning, with a permanent individual identification mark in the least painful manner possible.

2. Where a dog, cat or non-human primate is transferred from one breeder, supplier or user to another before it is weaned, and it is not practicable to mark it beforehand, a record, specifying in particular its mother, must be maintained by the receiver until it is marked.

3. Where an unmarked dog, cat or non-human primate, which is weaned, is received by a breeder, supplier or user it shall be permanently marked as soon as possible and in the least painful manner possible.

4. The breeder, supplier and user shall provide, at the request of the competent authority, reasons for which the animal is unmarked.

*Article 33***Care and accommodation**

1. Member States shall, as far as the care and accommodation of animals is concerned, ensure that:

- (a) all animals are provided with accommodation, an environment, food, water and care which are appropriate to their health and well-being;
- (b) any restrictions on the extent to which an animal can satisfy its physiological and ethological needs are kept to a minimum;
- (c) the environmental conditions in which animals are bred, kept or used are checked daily;
- (d) arrangements are made to ensure that any defect or avoidable pain, suffering, distress or lasting harm discovered is eliminated as quickly as possible; and
- (e) animals are transported under appropriate conditions.

2. For the purposes of paragraph 1, Member States shall ensure that the care and accommodation standards set out in Annex III are applied from the dates provided for therein.

3. Member States may allow exemptions from the requirements of paragraph 1(a) or paragraph 2 for scientific, animal-welfare or animal-health reasons.

Section 2

Inspections

Article 34

Inspections by the Member States

1. Member States shall ensure that the competent authorities carry out regular inspections of all breeders, suppliers and users, including their establishments, to verify compliance with the requirements of this Directive.

2. The competent authority shall adapt the frequency of inspections on the basis of a risk analysis for each establishment, taking account of:

- (a) the number and species of animals housed;
- (b) the record of the breeder, supplier or user in complying with the requirements of this Directive;
- (c) the number and types of projects carried out by the user in question; and
- (d) any information that might indicate non-compliance.

3. Inspections shall be carried out on at least one third of the users each year in accordance with the risk analysis referred to in paragraph 2. However, breeders, suppliers and users of non-human primates shall be inspected at least once a year.

4. An appropriate proportion of the inspections shall be carried out without prior warning.

5. Records of all inspections shall be kept for at least 5 years.

Article 35

Controls of Member State inspections

1. The Commission shall, when there is due reason for concern, taking into account, inter alia, the proportion of inspections carried out without prior warning, undertake controls of the infrastructure and operation of national inspections in Member States.

2. The Member State in the territory of which the control referred to in paragraph 1 is being carried out shall give all necessary assistance to the experts of the Commission in carrying out their duties. The Commission shall inform the competent authority of the Member State concerned of the results of the control.

3. The competent authority of the Member State concerned shall take measures to take account of the results of the control referred to in paragraph 1.

Section 3

Requirements for projects

Article 36

Project authorisation

1. Member States shall ensure, without prejudice to Article 42, that projects are not carried out without prior authorisation from the competent authority, and that projects are carried out in accordance with the authorisation or, in the cases referred to in Article 42, in accordance with the application sent to the competent authority or any decision taken by the competent authority.

2. Member States shall ensure that no project is carried out unless a favourable project evaluation by the competent authority has been received in accordance with Article 38.

Article 37

Application for project authorisation

1. Member States shall ensure that an application for project authorisation is submitted by the user or the person responsible for the project. The application shall include at least the following:

- (a) the project proposal;
- (b) a non-technical project summary; and
- (c) information on the elements set out in Annex VI.

2. Member States may waive the requirement in paragraph 1(b) for projects referred to in Article 42(1).

Article 38

Project evaluation

1. The project evaluation shall be performed with a degree of detail appropriate for the type of project and shall verify that the project meets the following criteria:

- (a) the project is justified from a scientific or educational point of view or required by law;
- (b) the purposes of the project justify the use of animals; and
- (c) the project is designed so as to enable procedures to be carried out in the most humane and environmentally sensitive manner possible.

2. The project evaluation shall consist in particular of the following:

- (a) an evaluation of the objectives of the project, the predicted scientific benefits or educational value;
- (b) an assessment of the compliance of the project with the requirement of replacement, reduction and refinement;
- (c) an assessment and assignment of the classification of the severity of procedures;

(d) a harm-benefit analysis of the project, to assess whether the harm to the animals in terms of suffering, pain and distress is justified by the expected outcome taking into account ethical considerations, and may ultimately benefit human beings, animals or the environment;

(e) an assessment of any justification referred to in Articles 6 to 12, 14, 16 and 33; and

(f) a determination as to whether and when the project should be assessed retrospectively.

3. The competent authority carrying out the project evaluation shall consider expertise in particular in the following areas:

(a) the areas of scientific use for which animals will be used including replacement, reduction and refinement in the respective areas;

(b) experimental design, including statistics where appropriate;

(c) veterinary practice in laboratory animal science or wildlife veterinary practice where appropriate;

(d) animal husbandry and care, in relation to the species that are intended to be used.

4. The project evaluation process shall be transparent.

Subject to safeguarding intellectual property and confidential information, the project evaluation shall be performed in an impartial manner and may integrate the opinion of independent parties.

Article 39

Retrospective assessment

1. Member States shall ensure that when determined in accordance with Article 38(2)(f), the retrospective assessment shall be carried out by the competent authority which shall, on the basis of the necessary documentation submitted by the user, evaluate the following:

(a) whether the objectives of the project were achieved;

(b) the harm inflicted on animals, including the numbers and species of animals used, and the severity of the procedures; and

(c) any elements that may contribute to the further implementation of the requirement of replacement, reduction and refinement.

2. All projects using non-human primates and projects involving procedures classified as 'severe', including those referred to in Article 15(2), shall undergo a retrospective assessment.

3. Without prejudice to paragraph 2 and by way of derogation from Article 38(2)(f), Member States may exempt projects involving only procedures classified as 'mild' or 'non-recovery' from the requirement for a retrospective assessment.

Article 40

Granting of project authorisation

1. The project authorisation shall be limited to procedures which have been subject to:

(a) a project evaluation; and

(b) the severity classifications assigned to those procedures.

2. The project authorisation shall specify the following:

(a) the user who undertakes the project;

(b) the persons responsible for the overall implementation of the project and its compliance with the project authorisation;

(c) the establishments in which the project will be undertaken, where applicable; and

(d) any specific conditions following the project evaluation, including whether and when the project shall be assessed retrospectively.

3. Project authorisations shall be granted for a period not exceeding 5 years.

4. Member States may allow the authorisation of multiple generic projects carried out by the same user if such projects are to satisfy regulatory requirements or if such projects use animals for production or diagnostic purposes with established methods.

Article 41

Authorisation decisions

1. Member States shall ensure that the decision regarding authorisation is taken and communicated to the applicant 40 working days at the latest from the receipt of the complete and correct application. This period shall include the project evaluation.

2. When justified by the complexity or the multi-disciplinary nature of the project, the competent authority may extend the period referred to in paragraph 1 once, by an additional period not exceeding 15 working days. The extension and its duration shall be duly motivated and shall be notified to the applicant before the expiry of the period referred to in paragraph 1.

3. Competent authorities shall acknowledge to the applicant all applications for authorisations as quickly as possible, and shall indicate the period referred to in paragraph 1 within which the decision is to be taken.

4. In the case of an incomplete or incorrect application, the competent authority shall, as quickly as possible, inform the applicant of the need to supply any additional documentation and of any possible effects on the running of the applicable time period.

Article 42

Simplified administrative procedure

1. Member States may decide to introduce a simplified administrative procedure for projects containing procedures classified as 'non-recovery', 'mild' or 'moderate' and not using non-human primates, that are necessary to satisfy regulatory requirements, or which use animals for production or diagnostic purposes with established methods.

2. When introducing a simplified administrative procedure, Member States shall ensure that the following provisions are met:

- (a) the application specifies elements referred to in Article 40(2)(a), (b) and (c);
- (b) a project evaluation is performed in accordance with Article 38; and
- (c) that the period referred to in Article 41(1) is not exceeded.

3. If a project is changed in a way that may have a negative impact on animal welfare, Member States shall require an additional project evaluation with a favourable outcome.

4. Article 40(3) and (4), Article 41(3) and Article 44(3), (4) and (5) shall apply *mutatis mutandis* to projects that are allowed to be carried out in accordance with this Article.

Article 43

Non-technical project summaries

1. Subject to safeguarding intellectual property and confidential information, the non-technical project summary shall provide the following:

- (a) information on the objectives of the project, including the predicted harm and benefits and the number and types of animals to be used;
- (b) a demonstration of compliance with the requirement of replacement, reduction and refinement.

The non-technical project summary shall be anonymous and shall not contain the names and addresses of the user and its personnel.

2. Member States may require the non-technical project summary to specify whether a project is to undergo a retrospective assessment and by what deadline. In such a case, Member States shall ensure that the non-technical project summary is updated with the results of any retrospective assessment.

3. Member States shall publish the non-technical project summaries of authorised projects and any updates thereto.

Article 44

Amendment, renewal and withdrawal of a project authorisation

1. Member States shall ensure that amendment or renewal of the project authorisation is required for any change of the project that may have a negative impact on animal welfare.

2. Any amendment or renewal of a project authorisation shall be subject to a further favourable outcome of the project evaluation.

3. The competent authority may withdraw the project authorisation where the project is not carried out in accordance with the project authorisation.

4. Where a project authorisation is withdrawn, the welfare of the animals used or intended to be used in the project must not be adversely affected.

5. Member States shall establish and publish conditions for amendment and renewal of project authorisations.

Article 45

Documentation

1. Member States shall ensure that all relevant documentation, including project authorisations and the result of the project evaluation is kept for at least 3 years from the expiry date of the authorisation of the project or from the expiry of the period referred to in Article 41(1) and shall be available to the competent authority.

2. Without prejudice to paragraph 1, the documentation for projects which have to undergo retrospective assessment shall be kept until the retrospective assessment has been completed.

CHAPTER V

AVOIDANCE OF DUPLICATION AND ALTERNATIVE APPROACHES

Article 46

Avoidance of duplication of procedures

Each Member State shall accept data from other Member States that are generated by procedures recognised by the legislation of the Union, unless further procedures need to be carried out regarding that data for the protection of public health, safety or the environment.

Article 47

Alternative approaches

1. The Commission and the Member States shall contribute to the development and validation of alternative approaches which could provide the same or higher levels of information as those obtained in procedures using animals, but which do not involve the use of animals or use fewer animals or which entail less painful procedures, and they shall take such other steps as they consider appropriate to encourage research in this field.

2. Member States shall assist the Commission in identifying and nominating suitable specialised and qualified laboratories to carry out such validation studies.

3. After consulting the Member States, the Commission shall set the priorities for those validation studies and allocate the tasks between the laboratories for carrying out those studies.

4. Member States shall, at national level, ensure the promotion of alternative approaches and the dissemination of information thereon.

5. Member States shall nominate a single point of contact to provide advice on the regulatory relevance and suitability of alternative approaches proposed for validation.

6. The Commission shall take appropriate action with a view to obtaining international acceptance of alternative approaches validated in the Union.

Article 48

Union Reference Laboratory

1. The Union Reference Laboratory and its duties and tasks shall be those referred to in Annex VII.

2. The Union Reference Laboratory may collect charges for the services it provides that do not directly contribute to the further advancement of replacement, reduction and refinement.

3. Detailed rules necessary for the implementation of paragraph 2 of this Article and Annex VII may be adopted in accordance with the regulatory procedure referred to in Article 56(3).

Article 49

National committees for the protection of animals used for scientific purposes

1. Each Member State shall establish a national committee for the protection of animals used for scientific purposes. It shall advise the competent authorities and animal-welfare bodies on matters dealing with the acquisition, breeding, accommodation, care and use of animals in procedures and ensure sharing of best practice.

2. The national committees referred to in paragraph 1 shall exchange information on the operation of animal-welfare bodies and project evaluation and share best practice within the Union.

CHAPTER VI

FINAL PROVISIONS

Article 50

Adaptation of Annexes to technical progress

In order to ensure that the provisions of Annexes I and III to VIII reflect the state of technical or scientific progress, taking into account the experience gained in the implementation of this Directive, in particular through the reporting referred to in Article 54(1), the Commission may adopt, by means of delegated acts in accordance with Article 51 and subject to

the conditions laid down in Articles 52 and 53, modifications of those Annexes, with the exception of provisions of Sections I and II of Annex VIII. The dates referred to in Section B of Annex III shall not be brought forward. When adopting such delegated acts, the Commission shall act in accordance with the relevant provisions of this Directive.

Article 51

Exercise of the delegation

1. The power to adopt delegated acts referred to in Article 50 shall be conferred on the Commission for a period of 8 years beginning on 9 November 2010. The Commission shall make a report in respect of the delegated power at the latest 12 months before the end of the 8-year period. The delegation of power shall be automatically extended for periods of an identical duration, unless the European Parliament or the Council revokes it in accordance with Article 52.

2. As soon as it adopts a delegated act, the Commission shall notify it simultaneously to the European Parliament and to the Council.

3. The power to adopt delegated acts is conferred on the Commission subject to the conditions laid down in Articles 52 and 53.

Article 52

Revocation of the delegation

1. The delegation of power referred to in Article 50 may be revoked at any time by the European Parliament or by the Council.

2. The institution which has commenced an internal procedure for deciding whether to revoke the delegation of power shall endeavour to inform the other institution and the Commission within a reasonable time before the final decision is taken, indicating the delegated power which could be subject to revocation and possible reasons for a revocation.

3. The decision of revocation shall put an end to the delegation of the power specified in that decision. It shall take effect immediately or at a later date specified therein. It shall not affect the validity of the delegated acts already in force. It shall be published in the *Official Journal of the European Union*.

Article 53

Objections to delegated acts

1. The European Parliament or the Council may object to a delegated act within a period of 2 months from the date of notification.

At the initiative of the European Parliament or the Council this period shall be extended by 2 months.

2. If, on expiry of that period, neither the European Parliament nor the Council has objected to the delegated act, it shall be published in the *Official Journal of the European Union* and shall enter into force at the date stated therein.

The delegated act may be published in the *Official Journal of the European Union* and enter into force before the expiry of that period if the European Parliament and the Council have both informed the Commission of their intention not to raise objections.

3. If the European Parliament or the Council objects to a delegated act, it shall not enter into force. The institution which objects shall state the reasons for objecting to the delegated act.

Article 54

Reporting

1. Member States shall by 10 November 2018, and every 5 years thereafter, send the information on the implementation of this Directive and in particular Articles 10(1), 26, 28, 34, 38, 39, 43 and 46 to the Commission.

2. Member States shall collect and make publicly available, on an annual basis, statistical information on the use of animals in procedures, including information on the actual severity of the procedures and on the origin and species of non-human primates used in procedures.

Member States shall submit that statistical information to the Commission by 10 November 2015 and every year thereafter.

3. Member States shall submit to the Commission, on annual basis, detailed information on exemptions granted under Article 6(4)(a).

4. The Commission shall by 10 May 2012 establish a common format for submitting the information referred to in paragraphs 1, 2, and 3 of this Article in accordance with the regulatory procedure referred to in Article 56(3).

Article 55

Safeguard clauses

1. Where a Member State has scientifically justifiable grounds for believing it is essential to use non-human primates for the purposes referred to in Article 8(1)(a)(i) with regard to human beings, but where the use is not undertaken with a view to the avoidance, prevention, diagnosis or treatment of debilitating or potentially life-threatening clinical conditions, it may adopt a provisional measure allowing such use, provided the purpose cannot be achieved by the use of species other than non-human primates.

2. Where a Member State has justifiable grounds for believing that action is essential for the preservation of the species or in relation to an unexpected outbreak of a life-threatening or debilitating clinical condition in human beings, it may adopt a provisional measure allowing the use of great apes in procedures having one of the purposes referred to in points (b)(i), (c) or (e) of Article 5; provided that the purpose of the procedure cannot be achieved by the use of species other

than great apes or by the use of alternative methods. However, the reference to Article 5(b)(i) shall not be taken to include the reference to animals and plants.

3. Where, for exceptional and scientifically justifiable reasons, a Member State deems it necessary to allow the use of a procedure involving severe pain, suffering or distress that is likely to be long-lasting and cannot be ameliorated, as referred to in Article 15(2), it may adopt a provisional measure to allow such procedure. Member States may decide not to allow the use of non-human primates in such procedures.

4. A Member State which has adopted a provisional measure in accordance with paragraph 1, 2 or 3 shall immediately inform the Commission and the other Member States thereof, giving reasons for its decision and submitting evidence of the situation as described in paragraphs 1, 2 and 3 on which the provisional measure is based.

The Commission shall put the matter before the Committee referred to in Article 56(1) within 30 days of receipt of the information from the Member State and shall, in accordance with the regulatory procedure referred to in Article 56(3), either:

(a) authorise the provisional measure for a time period defined in the decision; or

(b) require the Member State to revoke the provisional measure.

Article 56

Committee

1. The Commission shall be assisted by a Committee.

2. Where reference is made to this paragraph, Articles 3 and 7 of Decision 1999/468/EC shall apply, having regard to the provisions of Article 8 thereof.

3. Where reference is made to this paragraph, Articles 5 and 7 of Decision 1999/468/EC shall apply, having regard to the provisions of Article 8 thereof.

The period laid down in Article 5(6) of Decision 1999/468/EC shall be set at 3 months.

Article 57

Commission report

1. By 10 November 2019 and every 5 years thereafter, the Commission shall, based on the information received from the Member States under Article 54(1), submit to the European Parliament and the Council a report on the implementation of this Directive.

2. By 10 November 2019 and every 3 years thereafter, the Commission shall, based on the statistical information submitted by Member States under Article 54(2), submit to the European Parliament and the Council a summary report on that information.

*Article 58***Review**

The Commission shall review this Directive by 10 November 2017, taking into account advancements in the development of alternative methods not entailing the use of animals, in particular of non-human primates, and shall propose amendments, where appropriate.

The Commission shall, where appropriate, and in consultation with the Member States and stakeholders, conduct periodic thematic reviews of the replacement, reduction and refinement of the use of animals in procedures, paying specific attention to non-human primates, technological developments, and new scientific and animal-welfare knowledge.

*Article 59***Competent authorities**

1. Each Member State shall designate one or more competent authorities responsible for the implementation of this Directive.

Member States may designate bodies other than public authorities for the implementation of specific tasks laid down in this Directive only if there is proof that the body:

- (a) has the expertise and infrastructure required to carry out the tasks; and
- (b) is free of any conflict of interests as regards the performance of the tasks.

Bodies thus designated shall be considered competent authorities for the purposes of this Directive.

2. Each Member State shall communicate details of a national authority serving as contact point for the purposes of this Directive to the Commission by 10 February 2011, as well as any update to such data.

The Commission shall make publicly available the list of those contact points.

*Article 60***Penalties**

Member States shall lay down the rules on penalties applicable to infringements of the national provisions adopted pursuant to this Directive and shall take all measures necessary to ensure that they are implemented. The penalties provided for must be effective, proportionate and dissuasive. The Member States shall notify those provisions to the Commission by 10 February 2013, and shall notify the Commission without delay of any subsequent amendment affecting them.

*Article 61***Transposition**

1. Member States shall adopt and publish, by 10 November 2012, the laws, regulations and administrative provisions

necessary to comply with this Directive. They shall forthwith communicate to the Commission the text of those provisions.

They shall apply those provisions from 1 January 2013.

When Member States adopt those provisions, they shall contain a reference to this Directive or be accompanied by such reference on the occasion of their official publication. The method of making such reference shall be laid down by Member States.

2. Member States shall communicate to the Commission the text of the main provisions of national law which they adopt in the field covered by this Directive.

*Article 62***Repeal**

1. Directive 86/609/EEC is repealed with effect from 1 January 2013 with the exception of Article 13, which shall be repealed with effect from 10 May 2013.

2. References to the repealed Directive shall be construed as references to this Directive.

*Article 63***Amendment of Regulation (EC) No 1069/2009**

Point (a)(iv) of Article 8 of Regulation (EC) No 1069/2009 is replaced by the following:

- '(iv) animals used in a procedure or procedures defined in Article 3 of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (*), in cases where the competent authority decides that such animals or any of their body parts have the potential to pose serious health risks to humans or to other animals, as a result of that procedure or those procedures without prejudice to Article 3(2) of Regulation (EC) No 1831/2003;

(*) OJ L 276, 20.10.2010, p. 33'.

*Article 64***Transitional provisions**

1. Member States shall not apply laws, regulations and administrative provisions adopted in accordance with Articles 36 to 45 to projects which have been approved before 1 January 2013 and the duration of which does not extend beyond 1 January 2018.

2. Projects which have been approved before 1 January 2013 and the duration of which extends beyond 1 January 2018 shall obtain project authorisation by 1 January 2018.

*Article 65***Entry into force**

This Directive shall enter into force on the 20th day following its publication in the *Official Journal of the European Union*.

*Article 66***Addressees**

This Directive is addressed to the Member States.

Done at Strasbourg, 22 September 2010.

For the European Parliament
The President
J. BUZEK

For the Council
The President
O. CHASTEL

ANNEX I

LIST OF ANIMALS REFERRED TO IN ARTICLE 10

1. Mouse (*Mus musculus*)
2. Rat (*Rattus norvegicus*)
3. Guinea pig (*Cavia porcellus*)
4. Syrian (golden) hamster (*Mesocricetus auratus*)
5. Chinese hamster (*Cricetulus griseus*)
6. Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)
7. Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)
8. Dog (*Canis familiaris*)
9. Cat (*Felis catus*)
10. All species of non-human primates
11. Frog (*Xenopus (laevis, tropicalis)*, *Rana (temporaria, pipiens)*)
12. Zebra fish (*Danio rerio*)

ANNEX II

LIST OF NON-HUMAN PRIMATES AND DATES REFERRED TO IN THE SECOND SUBPARAGRAPH OF ARTICLE 10(1)

Species	Dates
Marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)	1 January 2013
Cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>)	5 years after the publication of the feasibility study referred to in Article 10(1), fourth subparagraph, provided the study does not recommend an extended period
Rhesus monkey (<i>Macaca mulatta</i>)	5 years after the publication of the feasibility study referred to in Article 10(1), fourth subparagraph, provided the study does not recommend an extended period
Other species of non-human primates	5 years after the publication of the feasibility study referred to in Article 10(1), fourth subparagraph, provided the study does not recommend an extended period

ANNEX III

REQUIREMENTS FOR ESTABLISHMENTS AND FOR THE CARE AND ACCOMMODATION OF ANIMALS**Section A: General section**

1. The physical facilities

1.1. Functions and general design

(a) All facilities shall be constructed so as to provide an environment which takes into account the physiological and ethological needs of the species kept in them. Facilities shall also be designed and managed to prevent access by unauthorised persons and the ingress or escape of animals.

(b) Establishments shall have an active maintenance programme to prevent and remedy any defect in buildings or equipment.

1.2. Holding rooms

(a) Establishments shall have a regular and efficient cleaning schedule for the rooms and shall maintain satisfactory hygienic standards.

(b) Walls and floors shall be surfaced with a material resistant to the heavy wear and tear caused by the animals and the cleaning process. The material shall not be detrimental to the health of the animals and shall be such that the animals cannot hurt themselves. Additional protection shall be given to any equipment or fixtures so that they are not damaged by the animals nor do they cause injury to the animals themselves.

(c) Species that are incompatible, for example predator and prey, or animals requiring different environmental conditions, shall not be housed in the same room nor, in the case of predator and prey, within sight, smell or sound of each other.

1.3. General and special purpose procedure rooms

(a) Establishments shall, where appropriate, have available laboratory facilities for the carrying out of simple diagnostic tests, post-mortem examinations, and/or the collection of samples that are to be subjected to more extensive laboratory investigations elsewhere. General and special purpose procedure rooms shall be available for situations where it is undesirable to carry out the procedures or observations in the holding rooms.

(b) Facilities shall be provided to enable newly-acquired animals to be isolated until their health status can be determined and the potential health risk to established animals assessed and minimised.

(c) There shall be accommodation for the separate housing of sick or injured animals.

1.4. Service rooms

(a) Store-rooms shall be designed, used and maintained to safeguard the quality of food and bedding. These rooms shall be vermin and insect-proof, as far as possible. Other materials, which may be contaminated or present a hazard to animals or staff, shall be stored separately.

(b) The cleaning and washing areas shall be large enough to accommodate the installations necessary to decontaminate and clean used equipment. The cleaning process shall be arranged so as to separate the flow of clean and dirty equipment to prevent the contamination of newly-cleaned equipment.

(c) Establishments shall provide for the hygienic storage and safe disposal of carcasses and animal waste.

(d) Where surgical procedures under aseptic conditions are required there shall be provision for one or more than one suitably equipped room, and facilities provided for postoperative recovery.

2. The environment and control thereof
 - 2.1. Ventilation and temperature
 - (a) Insulation, heating and ventilation of the holding room shall ensure that the air circulation, dust levels, and gas concentrations are kept within limits that are not harmful to the animals housed.
 - (b) Temperature and relative humidity in the holding rooms shall be adapted to the species and age groups housed. The temperature shall be measured and logged on a daily basis.
 - (c) Animals shall not be restricted to outdoor areas under climatic conditions which may cause them distress.
 - 2.2. Lighting
 - (a) Where natural light does not provide an appropriate light/dark cycle, controlled lighting shall be provided to satisfy the biological requirements of the animals and to provide a satisfactory working environment.
 - (b) Illumination shall satisfy the needs for the performance of husbandry procedures and inspection of the animals.
 - (c) Regular photoperiods and intensity of light adapted to the species shall be provided.
 - (d) When keeping albino animals, the lighting shall be adjusted to take into account their sensitivity to light.
 - 2.3. Noise
 - (a) Noise levels including ultrasound, shall not adversely affect animal welfare.
 - (b) Establishments shall have alarm systems that sound outside the sensitive hearing range of the animals, where this does not conflict with their audibility to human beings.
 - (c) Holding rooms shall where appropriate be provided with noise insulation and absorption materials.
 - 2.4. Alarm systems
 - (a) Establishments relying on electrical or mechanical equipment for environmental control and protection, shall have a stand-by system to maintain essential services and emergency lighting systems as well as to ensure that alarm systems themselves do not fail to operate.
 - (b) Heating and ventilation systems shall be equipped with monitoring devices and alarms.
 - (c) Clear instructions on emergency procedures shall be prominently displayed.
3. Care of animals
 - 3.1. Health
 - (a) Establishments shall have a strategy in place to ensure that a health status of the animals is maintained that safeguards animal welfare and meets scientific requirements. This strategy shall include regular health monitoring, a microbiological surveillance programme and plans for dealing with health breakdowns and shall define health parameters and procedures for the introduction of new animals.
 - (b) Animals shall be checked at least daily by a competent person. These checks shall ensure that all sick or injured animals are identified and appropriate action is taken.
 - 3.2. Animals taken from the wild
 - (a) Transport containers and means of transport adapted to the species concerned shall be available at capture sites, in case animals need to be moved for examination or treatment.
 - (b) Special consideration shall be given and appropriate measures taken for the acclimatisation, quarantine, housing, husbandry, care of animals taken from the wild and, as appropriate, provisions for setting them free at the end of procedures.

3.3. Housing and enrichment

(a) Housing

Animals, except those which are naturally solitary, shall be socially housed in stable groups of compatible individuals. In cases where single housing is allowed in accordance with article 33(3) the duration shall be limited to the minimum period necessary and visual, auditory, olfactory and/or tactile contact shall be maintained. The introduction or re-introduction of animals to established groups shall be carefully monitored to avoid problems of incompatibility and disrupted social relationships.

(b) Enrichment

All animals shall be provided with space of sufficient complexity to allow expression of a wide range of normal behaviour. They shall be given a degree of control and choice over their environment to reduce stress-induced behaviour. Establishments shall have appropriate enrichment techniques in place, to extend the range of activities available to the animals and increase their coping activities including physical exercise, foraging, manipulative and cognitive activities, as appropriate to the species. Environmental enrichment in animal enclosures shall be adapted to the species and individual needs of the animals concerned. The enrichment strategies in establishments shall be regularly reviewed and updated.

(c) Animal enclosures

Animal enclosures shall not be made out of materials detrimental to the health of the animals. Their design and construction shall be such that no injury to the animals is caused. Unless they are disposable, they shall be made from materials that will withstand cleaning and decontamination techniques. The design of animal enclosure floors shall be adapted to the species and age of the animals and be designed to facilitate the removal of excreta.

3.4. Feeding

(a) The form, content and presentation of the diet shall meet the nutritional and behavioural needs of the animal.

(b) The animals' diet shall be palatable and non-contaminated. In the selection of raw materials, production, preparation and presentation of feed, establishments shall take measures to minimise chemical, physical and microbiological contamination.

(c) Packing, transport and storage shall be such as to avoid contamination, deterioration or destruction. All feed hoppers, troughs or other utensils used for feeding shall be regularly cleaned and, if necessary, sterilised.

(d) Each animal shall be able to access the food, with sufficient feeding space provided to limit competition.

3.5. Watering

(a) Uncontaminated drinking water shall always be available to all animals.

(b) When automatic watering systems are used, they shall be regularly checked, serviced and flushed to avoid accidents. If solid-bottomed cages are used, care shall be taken to minimise the risk of flooding.

(c) Provision shall be made to adapt the water supply for aquaria and tanks to the needs and tolerance limits of the individual fish, amphibian and reptile species.

3.6. Resting and sleeping areas

(a) Bedding materials or sleeping structures adapted to the species shall always be provided, including nesting materials or structures for breeding animals.

(b) Within the animal enclosure, as appropriate to the species, a solid, comfortable resting area for all animals shall be provided. All sleeping areas shall be kept clean and dry.

3.7. Handling

Establishments shall set up habituation and training programmes suitable for the animals, the procedures and length of the project.

Section B: Species-specific section

1. Mice, rats, gerbils, hamsters and guinea pigs

In this and subsequent tables for mice, rats, gerbils, hamsters and guinea pigs, 'enclosure height' means the vertical distance between the enclosure floor and the top of the enclosure and this height applies over more than 50 % of the minimum enclosure floor area prior to the addition of enrichment devices.

When designing procedures, consideration shall be given to the potential growth of the animals to ensure adequate space is provided (as detailed in Tables 1.1 to 1.5) for the duration of the study.

Table 1.1.

Mice

	Body weight (g)	Minimum enclosure size (cm ²)	Floor area per animal (cm ²)	Minimum enclosure height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
In stock and during procedures	up to 20	330	60	12	1 January 2017
	over 20 to 25	330	70	12	
	over 25 to 30	330	80	12	
	over 30	330	100	12	
Breeding		330 For a monogamous pair (outbred/inbred) or a trio (inbred). For each additional female plus litter 180 cm ² shall be added.		12	
Stock at breeders (*)	less than 20	950	40	12	
Enclosure size 950 cm ²					
Enclosure size 1 500 cm ²	less than 20	1 500	30	12	

(*) Post-weaned mice may be kept at these higher stocking densities for the short period after weaning until issue, provided that the animals are housed in larger enclosures with adequate enrichment, and these housing conditions do not cause any welfare deficit such as increased levels of aggression, morbidity or mortality, stereotypes and other behavioural deficits, weight loss, or other physiological or behavioural stress responses.

Table 1.2.

Rats

	Body weight (g)	Minimum enclosure size (cm ²)	Floor area per animal (cm ²)	Minimum enclosure height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
In stock and during procedures (*)	up to 200	800	200	18	1 January 2017
	over 200 to 300	800	250	18	
	over 300 to 400	800	350	18	
	over 400 to 600	800	450	18	
	over 600	1 500	600	18	

	Body weight (g)	Minimum enclosure size (cm ²)	Floor area per animal (cm ²)	Minimum enclosure height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Breeding		800 Mother and litter. For each additional adult animal permanently added to the enclosure add 400 cm ²		18	
Stock at breeders (**) Enclosure size 1 500 cm ²	up to 50	1 500	100	18	
	over 50 to 100	1 500	125	18	
	over 100 to 150	1 500	150	18	
	over 150 to 200	1 500	175	18	
Stock at breeders (**) Enclosure size 2 500 cm ²	up to 100	2 500	100	18	
	over 100 to 150	2 500	125	18	
	over 150 to 200	2 500	150	18	

(*) In long-term studies, if space allowances per individual animal fall below those indicated above towards the end of such studies, priority shall be given to maintaining stable social structures.

(**) Post-weaned rats may be kept at these higher stocking densities for the short period after weaning until issue, provided that the animals are housed in larger enclosures with adequate enrichment, and these housing conditions do not cause any welfare deficit such as increased levels of aggression, morbidity or mortality, stereotypes and other behavioural deficits, weight loss, or other physiological or behavioural stress responses.

Table 1.3.

Gerbils

	Body weight (g)	Minimum enclosure size (cm ²)	Floor area per animal (cm ²)	Minimum enclosure height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
In stock and during procedures	up to 40	1 200	150	18	1 January 2017
	over 40	1 200	250	18	
Breeding		1 200 Monogamous pair or trio with offspring		18	

Table 1.4.

Hamsters

	Body weight (g)	Minimum enclosure size (cm ²)	Floor area per animal (cm ²)	Minimum enclosure height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
In stock and during procedures	up to 60	800	150	14	1 January 2017
	over 60 to 100	800	200	14	
	over 100	800	250	14	

	Body weight (g)	Minimum enclosure size (cm ²)	Floor area per animal (cm ²)	Minimum enclosure height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Breeding		800 Mother or monogamous pair with litter		14	
Stock at breeders (*)	less than 60	1 500	100	14	

(*) Post-weaned hamsters may be kept at these higher stocking densities, for the short period after weaning until issue provided that the animals are housed in larger enclosures with adequate enrichment, and these housing conditions do not cause any welfare deficit such as increased levels of aggression, morbidity or mortality, stereotypes and other behavioural deficits, weight loss, or other physiological or behavioural stress responses.

Table 1.5.

Guinea pigs

	Body weight (g)	Minimum enclosure size (cm ²)	Floor area per animal (cm ²)	Minimum en- closure height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
In stock and during procedures	up to 200	1 800	200	23	1 January 2017
	over 200 to 300	1 800	350	23	
	over 300 to 450	1 800	500	23	
	over 450 to 700	2 500	700	23	
	over 700	2 500	900	23	
Breeding		2 500 Pair with litter. For each add- itional breeding female add 1 000 cm ²		23	

2. Rabbits

During agricultural research, when the aim of the project requires that the animals are kept under similar conditions to those under which commercial farm animals are kept, the keeping of the animals shall at least follow the standards laid down in Directive 98/58/EC ⁽¹⁾.

A raised area shall be provided within the enclosure. This raised area must allow the animal to lie and sit and easily move underneath, and shall not cover more than 40 % of the floor space. When for scientific or veterinary reasons a raised area cannot be used, the enclosure shall be 33 % larger for a single rabbit and 60 % larger for two rabbits. Where a raised area is provided for rabbits of less than 10 weeks of age, the size of the raised area shall be at least of 55 cm by 25 cm and the height above the floor shall be such that the animals can make use of it.

Table 2.1.

Rabbits over 10 weeks of age

Table 2.1 is to be used for both cages and pens. The additional floor area is as a minimum 3 000 cm² per rabbit for the third, the fourth, the fifth and the sixth rabbit, while 2 500 cm² as a minimum shall be added for each additional rabbit above a number of six.

⁽¹⁾ Council Directive 98/58/EC of 20 July 1998 concerning the protection of animals kept for farming purposes (OJ L 221, 8.8.1998, p. 23).

Final body weight (kg)	Minimum floor area for one or two socially harmonious animals (cm ²)	Minimum height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
less than 3	3 500	45	1 January 2017
from 3 to 5	4 200	45	
over 5	5 400	60	

Table 2.2.

Doe plus litter

Doe weight (kg)	Minimum enclosure size (cm ²)	Addition for nest boxes (cm ²)	Minimum height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
less than 3	3 500	1 000	45	1 January 2017
from 3 to 5	4 200	1 200	45	
over 5	5 400	1 400	60	

Table 2.3.

Rabbits less than 10 weeks of age

Table 2.3 is to be used for both cages and pens.

Age	Minimum enclosure size (cm ²)	Minimum floor area per animal (cm ²)	Minimum height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Weaning to 7 weeks	4 000	800	40	1 January 2017
From 7 to 10 weeks	4 000	1 200	40	

Table 2.4.

Rabbits: Optimal dimensions for raised areas for enclosures having the dimensions indicated in Table 2.1.

Age in weeks	Final body weight (kg)	Optimum size (cm x cm)	Optimum height from the enclosure floor (cm)	Date referred to in Article 33(2)
over 10	less than 3	55 × 25	25	1 January 2017
	from 3 to 5	55 × 30	25	
	over 5	60 × 35	30	

3. Cats

Cats shall not be single-housed for more than 24 hours at a time. Cats that are repeatedly aggressive towards other cats shall be housed singly only if a compatible companion cannot be found. Social stress in all pair- or group-housed individuals shall be monitored at least weekly. Females with kittens under four weeks of age or in the last two weeks of pregnancy may be housed singly.

Table 3.

Cats

The minimum space in which a queen and litter may be held is the space for a single cat, which shall be gradually increased so that by 4 months of age litters have been rehoused following the space requirements for adults.

Areas for feeding and for litter trays shall not be less than 0,5 metres apart and shall not be interchanged.

	Floor (*) (m ²)	Shelves (m ²)	Height (m)	Date referred to in Article 33(2)
Minimum for one adult animal	1,5	0,5	2	1 January 2017
For each additional animal add	0,75	0,25	—	

(*) Floor area excluding shelves.

4. Dogs

Dogs shall where possible be provided with outside runs. Dogs shall not be single-housed for more than 4 hours at a time.

The internal enclosure shall represent at least 50 % of the minimum space to be made available to the dogs, as detailed in Table 4.1.

The space allowances detailed below are based on the requirements of beagles, but giant breeds such as St Bernards or Irish wolfhounds shall be provided with allowances significantly in excess of those detailed in Table 4.1. For breeds other than the laboratory beagle, space allowances shall be determined in consultation with veterinary staff.

Table 4.1.

Dogs

Dogs that are pair or group housed may each be constrained to half the total space provided (2 m² for a dog under 20 kg, 4 m² for a dog over 20 kg) while they are undergoing procedures as defined in this Directive, if this separation is essential for scientific purposes. The period for which a dog is so constrained shall not exceed 4 hours at a time.

A nursing bitch and litter shall have the same space allowance as a single bitch of equivalent weight. The whelping pen shall be designed so that the bitch can move to an additional compartment or raised area away from the puppies.

Weight (kg)	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum floor area for one or two animals (m ²)	For each additional animal add a minimum of (m ²)	Minimum height (m)	Date referred to in Article 33(2)
up to 20	4	4	2	2	1 January 2017
over 20	8	8	4	2	

Table 4.2.

Dogs — post-weaned stock

Weight of dog (kg)	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum floor area/ animal (m ²)	Minimum height (m)	Date referred to in Article 33(2)
up to 5	4	0,5	2	1 January 2017
over 5 to 10	4	1,0	2	
over 10 to 15	4	1,5	2	
over 15 to 20	4	2	2	
over 20	8	4	2	

5. Ferrets

Table 5.

Ferrets

	Minimum enclosure size (cm ²)	Minimum floor area per animal (cm ²)	Minimum height (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Animals up to 600 g	4 500	1 500	50	1 January 2017
Animals over 600 g	4 500	3 000	50	
Adult males	6 000	6 000	50	
Jill and litter	5 400	5 400	50	

6. Non-human primates

Young non-human primates shall not be separated from their mothers until they are, depending on the species, 6 to 12 months old.

The environment shall enable non-human primates to carry out a complex daily programme of activity. The enclosure shall allow non-human primates to adopt as wide a behavioural repertoire as possible, provide it with a sense of security, and a suitably complex environment to allow the animal to run, walk, climb and jump.

Table 6.1.

Marmosets and tamarins

	Minimum floor area of enclosures for 1 (*) or 2 animals plus offspring up to 5 months old (m ²)	Minimum volume per additional animal over 5 months (m ³)	Minimum enclosure height (m) (**)	Date referred to in Article 33(2)
Marmosets	0,5	0,2	1,5	1 January 2017
Tamarins	1,5	0,2	1,5	

(*) Animals shall be kept singly only in exceptional circumstances.

(**) The top of the enclosure shall be at least 1,8 m from the floor.

For marmosets and tamarins, separation from the mother shall not take place before 8 months of age.

Table 6.2.

Squirrel monkeys

Minimum floor area for 1 (*) or 2 animals (m ²)	Minimum volume per additional animal over 6 months of age (m ³)	Minimum enclosure height (m)	Date referred to in Article 33(2)
2,0	0,5	1,8	1 January 2017

(*) Animals shall be kept singly only in exceptional circumstances.

For squirrel monkeys, separation from the mother shall not take place before 6 months of age.

Table 6.3.

Macaques and vervets (*)

	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum enclosure volume (m ³)	Minimum volume per animal (m ³)	Minimum enclosure height (m)	Date referred to in Article 33(2)
Animals less than 3 yrs of age (**)	2,0	3,6	1,0	1,8	1 January 2017
Animals from 3 yrs of age (***)	2,0	3,6	1,8	1,8	
Animals held for breeding purposes (****)			3,5	2,0	

(*) Animals shall be kept singly only in exceptional circumstances.

(**) An enclosure of minimum dimensions may hold up to three animals.

(***) An enclosure of minimum dimensions may hold up to two animals.

(****) In breeding colonies no additional space/volume allowance is required for young animals up to 2 years of age housed with their mother.

For macaques and vervets, separation from the mother shall not take place before 8 months of age.

Table 6.4.

Baboons (*)

	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum enclosure volume (m ³)	Minimum volume per animal (m ³)	Minimum enclosure height (m)	Date referred to in Article 33(2)
Animals less than 4 yrs of age (**)	4,0	7,2	3,0	1,8	1 January 2017
Animals from 4 yrs of age (**)	7,0	12,6	6,0	1,8	
Animals held for breeding purposes (***)			12,0	2,0	

(*) Animals shall be kept singly only in exceptional circumstances.

(**) An enclosure of minimum dimensions may hold up to 2 animals.

(***) In breeding colonies no additional space/volume allowance is required for young animals up to 2 years of age housed with their mothers.

For baboons, separation from the mother shall not take place before 8 months of age.

7. Farm animals

During agricultural research, when the aim of the project requires that the animals are kept under similar conditions to those under which commercial farm animals are kept, the keeping of the animals shall comply at least with the standards laid down in Directives 98/58/EC, 91/629/EEC ⁽¹⁾ and 91/630/EEC ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Council Directive 91/629/EEC of 19 November 1991 laying down minimum standards for the protection of calves (OJ L 340, 11.12.1991, p. 28).

⁽²⁾ Council Directive 91/630/EEC of 19 November 1991 laying down minimum standards for the protection of pigs (OJ L 340, 11.12.1991, p. 33).

Table 7.1.

Cattle

Body weight (kg)	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum floor area/animal (m ² /animal)	Trough space for ad-libitum feeding of polled cattle (m/animal)	Trough space for restricted feeding of polled cattle (m/animal)	Date referred to in Article 33(2)
up to 100	2,50	2,30	0,10	0,30	1 January 2017
over 100 to 200	4,25	3,40	0,15	0,50	
over 200 to 400	6,00	4,80	0,18	0,60	
over 400 to 600	9,00	7,50	0,21	0,70	
over 600 to 800	11,00	8,75	0,24	0,80	
over 800	16,00	10,00	0,30	1,00	

Table 7.2.

Sheep and goats

Body weight (kg)	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum floor area/animal (m ² /animal)	Minimum partition height (m)	Trough space for ad-libitum feeding (m/animal)	Trough space for restricted feeding (m/animal)	Date referred to in Article 33(2)
less than 20	1,0	0,7	1,0	0,10	0,25	1 January 2017
over 20 to 35	1,5	1,0	1,2	0,10	0,30	
over 35 to 60	2,0	1,5	1,2	0,12	0,40	
over 60	3,0	1,8	1,5	0,12	0,50	

Table 7.3.

Pigs and minipigs

Live weight (kg)	Minimum enclosure size (*) (m ²)	Minimum floor area per animal (m ² /animal)	Minimum lying space per animal (in, thermoneutral conditions) (m ² /animal)	Date referred to in Article 33(2)
Up to 5	2,0	0,20	0,10	1 January 2017
over 5 to 10	2,0	0,25	0,11	
over 10 to 20	2,0	0,35	0,18	
over 20 to 30	2,0	0,50	0,24	
over 30 to 50	2,0	0,70	0,33	
over 50 to 70	3,0	0,80	0,41	
over 70 to 100	3,0	1,00	0,53	

Live weight (kg)	Minimum enclosure size (*) (m ²)	Minimum floor area per animal (m ² /animal)	Minimum lying space per animal (in, thermoneutral conditions) (m ² /animal)	Date referred to in Article 33(2)
over 100 to 150	4,0	1,35	0,70	
over 150	5,0	2,50	0,95	
Adult (conventional) boars	7,5		1,30	

(*) Pigs may be confined in smaller enclosures for short periods of time, for example by partitioning the main enclosure using dividers, when justified on veterinary or experimental grounds, for example where individual food consumption is required.

Table 7.4.

Equines

The shortest side shall be a minimum of 1,5 times the wither height of the animal. The height of indoor enclosures shall allow animals to rear to their full height.

Wither height (m)	Minimum floor area/animal (m ² /animal)			Minimum enclosure height (m)	Date referred to in Article 33(2)
	For each animal held singly or in groups of up to 3 animals	For each animal held in groups of 4 or more animals	Foaling box/mare with foal		
1,00 to 1,40	9,0	6,0	16	3,00	1 January 2017
over 1,40 to 1,60	12,0	9,0	20	3,00	
over 1,60	16,0	$(2 \times WH)^2$ (*)	20	3,00	

(*) To ensure adequate space is provided, space allowances for each individual animal shall be based on height to withers (WH).

8. Birds

During agricultural research, when the aim of the project requires that the animals are kept under similar conditions to those under which commercial farm animals are kept, the keeping of the animals shall comply at least with the standards laid down in Directives 98/58/EC, 1999/74/EC ⁽¹⁾ and 2007/43/EC ⁽²⁾.

Table 8.1.

Domestic fowl

Where these minimum enclosure sizes cannot be provided for scientific reasons, the duration of the confinement shall be justified by the experimenter in consultation with veterinary staff. In such circumstances, birds can be housed in smaller enclosures containing appropriate enrichment and with a minimum floor area of 0,75 m².

Body mass (g)	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum area per bird (m ²)	Minimum height (cm)	Minimum length of feed trough per bird (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Up to 200	1,00	0,025	30	3	1 January 2017
over 200 to 300	1,00	0,03	30	3	
over 300 to 600	1,00	0,05	40	7	

⁽¹⁾ Council Directive 1999/74/EC of 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens (OJ L 203, 3.8.1999, p. 53).

⁽²⁾ Council Directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down minimum rules for the protection of chickens kept for meat production (OJ L 182, 12.7.2007, p. 19).

Body mass (g)	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum area per bird (m ²)	Minimum height (cm)	Minimum length of feed trough per bird (cm)	Date referred to in Article 33(2)
over 600 to 1 200	2,00	0,09	50	15	
over 1 200 to 1 800	2,00	0,11	75	15	
over 1 800 to 2 400	2,00	0,13	75	15	
over 2 400	2,00	0,21	75	15	

Table 8.2.

Domestic turkeys

All enclosure sides shall be at least 1,5 m long. Where these minimum enclosure sizes cannot be provided for scientific reasons, the duration of the confinement shall be justified by the experimenter in consultation with veterinary staff. In such circumstances, birds can be housed in smaller enclosures containing appropriate enrichment and with a minimum floor area of 0,75 m² and a minimum height of 50 cm for birds below 0,6 kg, 75 cm for birds below 4 kg, and 100 cm for birds over 4 kg. These can be used to house small groups of birds in accordance with the space allowances given in table 8.2.

Body mass (kg)	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum area per bird (m ²)	Minimum height (cm)	Minimum length of feed trough per bird (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Up to 0,3	2,00	0,13	50	3	1 January 2017
over 0,3 to 0,6	2,00	0,17	50	7	
over 0,6 to 1	2,00	0,30	100	15	
over 1 to 4	2,00	0,35	100	15	
over 4 to 8	2,00	0,40	100	15	
over 8 to 12	2,00	0,50	150	20	
over 12 to 16	2,00	0,55	150	20	
over 16 to 20	2,00	0,60	150	20	
over 20	3,00	1,00	150	20	

Table 8.3.

Quails

Body mass (g)	Minimum enclosure size (m ²)	Area per bird pair-housed (m ²)	Area per additional bird group-housed (m ²)	Minimum height (cm)	Minimum length of trough per bird (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Up to 150	1,00	0,5	0,10	20	4	1 January 2017
Over 150	1,00	0,6	0,15	30	4	

Table 8.4.

Ducks and geese

Where these minimum enclosures sizes cannot be provided for scientific reasons, the duration of the confinement shall be justified by the experimenter in consultation with veterinary staff. In such circumstances, birds can be housed in smaller enclosures containing appropriate enrichment and with a minimum floor area of 0,75 m². These can be used to house small groups of birds in accordance with the space allowances given in table 8.4.

Body mass (g)	Minimum enclosure size (m ²)	Area per bird (m ²) (*)	Minimum height (cm)	Minimum length of feed trough per bird (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Ducks					1 January 2017
Up to 300	2,00	0,10	50	10	
Over 300 to 1 200 (**)	2,00	0,20	200	10	
Over 1 200 to 3 500	2,00	0,25	200	15	
Over 3 500	2,00	0,50	200	15	
Geese					
Up to 500	2,00	0,20	200	10	
Over 500 to 2 000	2,00	0,33	200	15	
Over 2 000	2,00	0,50	200	15	

(*) This shall include a pond of minimum area 0,5 m² per 2 m² enclosure with a minimum depth of 30 cm. The pond may contribute up to 50 % of the minimum enclosure size.

(**) Pre-fledged birds may be held in enclosures with a minimum height of 75 cm.

Table 8.5.

Ducks and geese: Minimum pond sizes (*)

	Area (m ²)	Depth (cm)
Ducks	0,5	30
Geese	0,5	from 10 to 30

(*) Pond sizes are per 2 m² enclosure. The pond may contribute up to 50 % of the minimum enclosure size.

Table 8.6.

Pigeons

Enclosures shall be long and narrow (for example 2 m by 1 m) rather than square to allow birds to perform short flights.

Group size	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum height (cm)	Minimum length of food trough per bird (cm)	Minimum length of perch per bird (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Up to 6	2	200	5	30	1 January 2017

Group size	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum height (cm)	Minimum length of food trough per bird (cm)	Minimum length of perch per bird (cm)	Date referred to in Article 33(2)
from 7 to 12	3	200	5	30	
for each additional bird above 12	0,15		5	30	

Table 8.7.

Zebra finches

Enclosures shall be long and narrow (for example 2 m by 1 m) to enable birds to perform short flights. For breeding studies, pairs may be housed in smaller enclosures containing appropriate enrichment with a minimum floor area of 0,5 m² and a minimum height of 40 cm. The duration of the confinement shall be justified by the experimenter in consultation with veterinary staff.

Group size	Minimum enclosure size (m ²)	Minimum height (cm)	Minimum number of feeders	Date referred to in Article 33(2)
Up to 6	1,0	100	2	1 January 2017
7 to 12	1,5	200	2	
13 to 20	2,0	200	3	
for each additional bird above 20	0,05		1 per 6 birds	

9. Amphibians

Table 9.1.

Aquatic urodeles

Body length (*) (cm)	Minimum water surface area (cm ²)	Minimum water surface area for each additional animal in group-holding (cm ²)	Minimum water depth (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Up to 10	262,5	50	13	1 January 2017
over 10 to 15	525	110	13	
over 15 to 20	875	200	15	
over 20 to 30	1 837,5	440	15	
Over 30	3 150	800	20	

(*) Measured from snout to vent.

Table 9.2.

Aquatic anurans (*)

Body length (**) (cm)	Minimum water surface area (cm ²)	Minimum water surface area for each additional animal in group-holding (cm ²)	Minimum water depth (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Less than 6	160	40	6	1 January 2017
from 6 to 9	300	75	8	

Body length (**) (cm)	Minimum water surface area (cm ²)	Minimum water surface area for each additional animal in group-holding (cm ²)	Minimum water depth (cm)	Date referred to in Article 33(2)
over 9 to 12	600	150	10	
over 12	920	230	12,5	

(*) These conditions apply to holding (i.e. husbandry) tanks but not to those tanks used for natural mating and super-ovulation for reasons of efficiency, as the latter procedures require smaller individual tanks. Space requirements determined for adults in the indicated size categories; juveniles and tadpoles shall either be excluded, or dimensions altered according to the scaling principle.

(**) Measured from snout to vent.

Table 9.3.

Semi-aquatic anurans

Body length (*) (cm)	Minimum enclosure size (**) (cm ²)	Minimum area for each additional animal in group holding (cm ²)	Minimum enclosure height (***) (cm)	Minimum water depth (cm)	Date referred to in Article 33(2)
up to 5,0	1 500	200	20	10	1 January 2017
over 5,0 to 7,5	3 500	500	30	10	
Over 7,5	4 000	700	30	15	

(*) Measured from snout to vent.

(**) One-third land division, two-thirds water division sufficient for animals to submerge.

(***) Measured from the surface of the land division up to the inner part of the top of the terrarium; furthermore, the height of the enclosures shall be adapted to the interior design.

Table 9.4.

Semi-terrestrial anurans

Body length (*) (cm)	Minimum enclosure size (**) (cm ²)	Minimum area for each additional animal in group-holding (cm ²)	Minimum enclosure height (***) (cm)	Minimum water depth (cm)	Date referred to in Article 33(2)
Up to 5,0	1 500	200	20	10	1 January 2017
over 5,0 to 7,5	3 500	500	30	10	
over 7,5	4 000	700	30	15	

(*) Measured from snout to vent.

(**) Two-thirds land division, one-third water division sufficient for animals to submerge.

(***) Measured from the surface of the land division up to the inner part of the top of the terrarium; furthermore, the height of the enclosures shall be adapted to the interior design.

Table 9.5.

Arboreal anurans

Body length (*) (cm)	Minimum enclosure size (**) (cm ²)	Minimum area for each additional animal in group-holding (cm ²)	Minimum enclosure height (***) (cm)	Date referred to in Article 33(2)
up to 3,0	900	100	30	1 January 2017
Over 3,0	1 500	200	30	

(*) Measured from snout to vent.

(**) Two-thirds land division, one-third pool division sufficient for animals to submerge.

(***) Measured from the surface of the land division up to the inner part of the top of the terrarium; furthermore, the height of the enclosures shall be adapted to the interior design.

10. Reptiles

Table 10.1.

Aquatic chelonians

Body length (*) (cm)	Minimum water surface area (cm ²)	Minimum water surface area for each additional animal in group holding (cm ²)	Minimum water depth (cm)	Date referred to in Article 33(2)
up to 5	600	100	10	1 January 2017
Over 5 to 10	1 600	300	15	
Over 10 to 15	3 500	600	20	
Over 15 to 20	6 000	1 200	30	
Over 20 to 30	10 000	2 000	35	
Over 30	20 000	5 000	40	

(*) Measured in a straight line from the front edge to the back edge of the shell.

Table 10.2.

Terrestrial snakes

Body length (*) (cm)	Minimum floor area (cm ²)	Minimum area for each additional animal in group-holding (cm ²)	Minimum enclosure height (**) (cm)	Date referred to in Article 33(2)
up to 30	300	150	10	1 January 2017
Over 30 to 40	400	200	12	
Over 40 to 50	600	300	15	
Over 50 to 75	1 200	600	20	
Over 75	2 500	1 200	28	

(*) Measured from snout to tail.

(**) Measured from the surface of the land division up to the inner part of the top of the terrarium; furthermore, the height of the enclosure shall be adapted to the interior design.

11. Fish

11.1. Water supply and quality

Adequate water supply of suitable quality shall be provided at all times. Water flow in re-circulatory systems or filtration within tanks shall be sufficient to ensure that water quality parameters are maintained within acceptable levels. Water supply shall be filtered or treated to remove substances harmful to fish, where necessary. Water-quality parameters shall at all times be within the acceptable range that sustains normal activity and physiology for a given species and stage of development. The water flow shall be appropriate to enable fish to swim correctly and to maintain normal behaviour. Fish shall be given an appropriate time for acclimatisation and adaptation to changes in water-quality conditions.

11.2. Oxygen, nitrogen compounds, pH, and salinity

Oxygen concentration shall be appropriate to the species and to the context in which the fish are held. Where necessary, supplementary aeration of tank water shall be provided. The concentrations of nitrogen compounds shall be kept low.

The pH level shall be adapted to the species and kept as stable as possible. The salinity shall be adapted to the requirements of the fish species and to the life stage of the fish. Changes in salinity shall take place gradually.

11.3. Temperature, lighting, noise

Temperature shall be maintained within the optimal range for the fish species concerned and kept as stable as possible. Changes in temperature shall take place gradually. Fish shall be maintained on an appropriate photoperiod. Noise levels shall be kept to a minimum and, where possible, equipment causing noise or vibration, such as power generators or filtration systems, shall be separate from the fish-holding tanks.

11.4. Stocking density and environmental complexity

The stocking density of fish shall be based on the total needs of the fish in respect of environmental conditions, health and welfare. Fish shall have sufficient water volume for normal swimming, taking account of their size, age, health and feeding method. Fish shall be provided with an appropriate environmental enrichment, such as hiding places or bottom substrate, unless behavioural traits suggest none is required.

11.5. Feeding and handling

Fish shall be fed a diet suitable for the fish at an appropriate feeding rate and frequency. Particular attention shall be given to feeding of larval fish during any transition from live to artificial diets. Handling of fish shall be kept to a minimum.

ANNEX IV

METHODS OF KILLING ANIMALS

1. In the process of killing animals, methods listed in the table below shall be used.

Methods other than those listed in the table may be used:

- (a) on unconscious animals, providing the animal does not regain consciousness before death;
- (b) on animals used in agricultural research, when the aim of the project requires that the animals are kept under similar conditions to those under which commercial farm animals are kept; these animals may be killed in accordance with the requirements laid down in Annex I to Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killing ⁽¹⁾.

2. The killing of animals shall be completed by one of the following methods:

- (a) confirmation of permanent cessation of the circulation;
- (b) destruction of the brain;
- (c) dislocation of the neck;
- (d) exsanguination; or
- (e) confirmation of the onset of *rigor mortis*.

3. Table

Animals-remarks/ methods	Fish	Amphibians	Reptiles	Birds	Rodents	Rabbits	Dogs, cats, ferrets and foxes	Large mammals	Non-human primates
Anaesthetic overdose	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Captive bolt			(2)						
Carbon dioxide					(3)				
Cervical dislocation				(4)	(5)	(6)			
Concussion/ percussive blow to the head				(7)	(8)	(9)	(10)		
Decapitation				(11)	(12)				
Electrical stunning	(13)	(13)		(13)		(13)	(13)	(13)	
Inert gases (Ar, N ₂)								(14)	
Shooting with a free bullet with appropriate rifles, guns and ammunition			(15)				(16)	(15)	

⁽¹⁾ OJ L 303, 18.11.2009, p. 1.

Requirements

1. Shall, where appropriate, be used with prior sedation.
 2. Only to be used on large reptiles.
 3. Only to be used in gradual fill. Not to be used for foetal and neonate rodents.
 4. Only to be used for birds under 1 kg. Birds over 250 g shall be sedated.
 5. Only to be used for rodents under 1 kg. Rodents over 150 g shall be sedated.
 6. Only to be used for rabbits under 1 kg. Rabbits over 150 g shall be sedated.
 7. Only to be used for birds under 5 kg.
 8. Only to be used for rodents under 1 kg.
 9. Only to be used for rabbits under 5 kg.
 10. Only to be used on neonates.
 11. Only to be used for birds under 250 g.
 12. Only to be used if other methods are not possible.
 13. Specialised equipment required.
 14. Only to be used on pigs.
 15. Only to be used in field conditions by experienced marksmen.
 16. Only to be used in field conditions by experienced marksmen when other methods are not possible.
-

ANNEX V

LIST OF ELEMENTS REFERRED TO IN ARTICLE 23(3)

1. National legislation in force relevant to the acquisition, husbandry, care and use of animals for scientific purposes.
 2. Ethics in relation to human-animal relationship, intrinsic value of life and arguments for and against the use of animals for scientific purposes.
 3. Basic and appropriate species-specific biology in relation to anatomy, physiological features, breeding, genetics and genetic alteration.
 4. Animal behaviour, husbandry and enrichment.
 5. Species-specific methods of handling and procedures, where appropriate.
 6. Animal health management and hygiene.
 7. Recognition of species-specific distress, pain and suffering of most common laboratory species.
 8. Anaesthesia, pain relieving methods and killing.
 9. Use of humane end-points.
 10. Requirement of replacement, reduction and refinement.
 11. Design of procedures and projects, where appropriate.
-

ANNEX VI

LIST OF ELEMENTS REFERRED TO IN ARTICLE 37(1)(c)

1. Relevance and justification of the following:
 - (a) use of animals including their origin, estimated numbers, species and life stages;
 - (b) procedures.
 2. Application of methods to replace, reduce and refine the use of animals in procedures.
 3. The planned use of anaesthesia, analgesia and other pain relieving methods.
 4. Reduction, avoidance and alleviation of any form of animal suffering, from birth to death where appropriate.
 5. Use of humane end-points.
 6. Experimental or observational strategy and statistical design to minimise animal numbers, pain, suffering, distress and environmental impact where appropriate.
 7. Reuse of animals and the accumulative effect thereof on the animals.
 8. The proposed severity classification of procedures.
 9. Avoidance of unjustified duplication of procedures where appropriate.
 10. Housing, husbandry and care conditions for the animals.
 11. Methods of killing.
 12. Competence of persons involved in the project.
-

ANNEX VII

DUTIES AND TASKS OF THE UNION REFERENCE LABORATORY

1. The Union Reference Laboratory referred to in Article 48 is the Commission's Joint Research Centre.
 2. The Union Reference Laboratory shall be responsible, in particular, for:
 - (a) coordinating and promoting the development and use of alternatives to procedures including in the areas of basic and applied research and regulatory testing;
 - (b) coordinating the validation of alternative approaches at Union level;
 - (c) acting as a focal point for the exchange of information on the development of alternative approaches;
 - (d) setting up, maintaining and managing public databases and information systems on alternative approaches and their state of development;
 - (e) promoting dialogue between legislators, regulators, and all relevant stakeholders, in particular, industry, biomedical scientists, consumer organisations and animal-welfare groups, with a view to the development, validation, regulatory acceptance, international recognition, and application of alternative approaches.
 3. The Union Reference Laboratory shall participate in the validation of alternative approaches.
-

ANNEX VIII

SEVERITY CLASSIFICATION OF PROCEDURES

The severity of a procedure shall be determined by the degree of pain, suffering, distress or lasting harm expected to be experienced by an individual animal during the course of the procedure.

Section I: Severity categories

Non-recovery:

Procedures which are performed entirely under general anaesthesia from which the animal shall not recover consciousness shall be classified as 'non-recovery'.

Mild:

Procedures on animals as a result of which the animals are likely to experience short-term mild pain, suffering or distress, as well as procedures with no significant impairment of the well-being or general condition of the animals shall be classified as 'mild'.

Moderate:

Procedures on animals as a result of which the animals are likely to experience short-term moderate pain, suffering or distress, or long-lasting mild pain, suffering or distress as well as procedures that are likely to cause moderate impairment of the well-being or general condition of the animals shall be classified as 'moderate'.

Severe:

Procedures on animals as a result of which the animals are likely to experience severe pain, suffering or distress, or long-lasting moderate pain, suffering or distress as well as procedures, that are likely to cause severe impairment of the well-being or general condition of the animals shall be classified as 'severe'.

Section II: Assignment criteria

The assignment of the severity category shall take into account any intervention or manipulation of an animal within a defined procedure. It shall be based on the most severe effects likely to be experienced by an individual animal after applying all appropriate refinement techniques.

When assigning a procedure to a particular category, the type of procedure and a number of other factors shall be taken into account. All these factors shall be considered on a case-by-case basis.

The factors related to the procedure shall include:

- type of manipulation, handling,
- nature of pain, suffering, distress or lasting harm caused by (all elements of) the procedure, and its intensity, the duration, frequency and multiplicity of techniques employed,
- cumulative suffering within a procedure,
- prevention from expressing natural behaviour including restrictions on the housing, husbandry and care standards.

Examples are given in Section III of procedures assigned to each of the severity categories on the basis of factors related to the type of the procedure alone. They shall provide the first indication as to what classification would be the most appropriate for a certain type of procedure.

However, for the purposes of the final severity classification of the procedure, the following additional factors, assessed on a case-by-case basis, shall also be taken into account:

- type of species and genotype,
- maturity, age and gender of the animal,
- training experience of the animal with respect to the procedure,
- if the animal is to be reused, the actual severity of the previous procedures,
- the methods used to reduce or eliminate pain, suffering and distress, including refinement of housing, husbandry and care conditions,
- humane end-points.

Section III:

Examples of different types of procedure assigned to each of the severity categories on the basis of factors related to the type of the procedure

1. Mild:

- (a) administration of anaesthesia except for the sole purpose of killing;
- (b) pharmacokinetic study where a single dose is administered and a limited number of blood samples are taken (totalling < 10 % of circulating volume) and the substance is not expected to cause any detectable adverse effect;
- (c) non-invasive imaging of animals (e.g. MRI) with appropriate sedation or anaesthesia;
- (d) superficial procedures, e.g. ear and tail biopsies, non-surgical subcutaneous implantation of mini-pumps and transponders;
- (e) application of external telemetry devices that cause only minor impairment to the animals or minor interference with normal activity and behaviour;
- (f) administration of substances by subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal routes, gavage and intravenously via superficial blood vessels, where the substance has no more than mild impact on the animal, and the volumes are within appropriate limits for the size and species of the animal;
- (g) induction of tumours, or spontaneous tumours, that cause no detectable clinical adverse effects (e.g. small, subcutaneous, non-invasive nodules);
- (h) breeding of genetically altered animals, which is expected to result in a phenotype with mild effects;
- (i) feeding of modified diets, that do not meet all of the animals' nutritional needs and are expected to cause mild clinical abnormality within the time-scale of the study;
- (j) short-term (< 24h) restraint in metabolic cages;
- (k) studies involving short-term deprivation of social partners, short-term solitary caging of adult rats or mice of sociable strains;

- (l) models which expose animals to noxious stimuli which are briefly associated with mild pain, suffering or distress, and which the animals can successfully avoid;

(m) a combination or accumulation of the following examples may result in classification as 'mild':

- (i) assessing body composition by non-invasive measures and with minimal restraint;
- (ii) monitoring ECG with non-invasive techniques with minimal or no restraint of habituated animals;
- (iii) application of external telemetry devices that are expected to cause no impairment to socially adapted animals and do not interfere with normal activity and behaviour;
- (iv) breeding genetically altered animals which are expected to have no clinically detectable adverse phenotype;
- (v) adding inert markers in the diet to follow passage of digesta;
- (vi) withdrawal of food for < 24h in adult rats;
- (vii) open field testing.

2. Moderate:

- (a) frequent application of test substances which produce moderate clinical effects, and withdrawal of blood samples (> 10 % of circulating volume) in a conscious animal within a few days without volume replacement;
- (b) acute dose-range finding studies, chronic toxicity/carcinogenicity tests, with non-lethal end-points;
- (c) surgery under general anaesthesia and appropriate analgesia, associated with post surgical pain, suffering or impairment of general condition. Examples include: thoracotomy, craniotomy, laparotomy, orchidectomy, lymphadenectomy, thyroidectomy, orthopaedic surgery with effective stabilisation and wound management, organ transplantation with effective management of rejection, surgical implantation of catheters, or biomedical devices (e.g. telemetry transmitters, minipumps etc.);
- (d) models of induction of tumours, or spontaneous tumours, that are expected to cause moderate pain or distress or moderate interference with normal behaviour;
- (e) irradiation or chemotherapy with a sublethal dose, or with an otherwise lethal dose but with reconstitution of the immune system. Adverse effects would be expected to be mild or moderate and would be short-lived (< 5 days);
- (f) breeding of genetically altered animals which are expected to result in a phenotype with moderate effects;
- (g) creation of genetically altered animals through surgical procedures;
- (h) use of metabolic cages involving moderate restriction of movement over a prolonged period (up to 5 days);
- (i) studies with modified diets that do not meet all of the animals' nutritional needs and are expected to cause moderate clinical abnormality within the time-scale of the study;
- (j) withdrawal of food for 48 hours in adult rats;
- (k) evoking escape and avoidance reactions where the animal is unable to escape or avoid the stimulus, and are expected to result in moderate distress.

3. Severe:

- (a) toxicity testing where death is the end-point, or fatalities are to be expected and severe pathophysiological states are induced. For example, single dose acute toxicity testing (see OECD testing guidelines);
 - (b) testing of device where failure may cause severe pain, distress or death of the animal (e.g. cardiac assist devices);
 - (c) vaccine potency testing characterised by persistent impairment of the animal's condition, progressive disease leading to death, associated with long-lasting moderate pain, distress or suffering;
 - (d) irradiation or chemotherapy with a lethal dose without reconstitution of the immune system, or reconstitution with production of graft versus host disease;
 - (e) models with induction of tumours, or with spontaneous tumours, that are expected to cause progressive lethal disease associated with long-lasting moderate pain, distress or suffering. For example tumours causing cachexia, invasive bone tumours, tumours resulting in metastatic spread, and tumours that are allowed to ulcerate;
 - (f) surgical and other interventions in animals under general anaesthesia which are expected to result in severe or persistent moderate postoperative pain, suffering or distress or severe and persistent impairment of the general condition of the animals. Production of unstable fractures, thoracotomy without adequate analgesia, or trauma to produce multiple organ failure;
 - (g) organ transplantation where organ rejection is likely to lead to severe distress or impairment of the general condition of the animals (e.g. xenotransplantation);
 - (h) breeding animals with genetic disorders that are expected to experience severe and persistent impairment of general condition, for example Huntington's disease, Muscular dystrophy, chronic relapsing neuritis models;
 - (i) use of metabolic cages involving severe restriction of movement over a prolonged period;
 - (j) inescapable electric shock (e.g. to produce learned helplessness);
 - (k) complete isolation for prolonged periods of social species e.g. dogs and non-human primates;
 - (l) immobilisation stress to induce gastric ulcers or cardiac failure in rats;
 - (m) forced swim or exercise tests with exhaustion as the end-point.
-

INSERSO, sin que ello suponga menoscabo a la información que sirve de base al reconocimiento y control de las mismas.

Ello requiere adecuar los medios materiales de la propia Administración gestora a fin de utilizar con la máxima celeridad la información de que ya dispone para acreditar determinadas circunstancias o contrastar la información facilitada por el solicitante, agilizar la comunicación con otras Administraciones en orden a obtener de oficio la información que sea precisa, evitando desplazamientos al interesado y por último simplificar la información en un mismo expediente al incorporar en el modelo de solicitud determinados datos que se venían aportando en documentos independientes.

Asimismo y con el doble objetivo de agilización y acortamiento de tiempos de trámite y pago de las prestaciones, esta reducción de documentos irá acompañada, por un lado, de la revisión del procedimiento administrativo del trámite de prestaciones, haciéndolo uniforme para todos los órganos gestores provinciales, suprimiendo trámites innecesarios y fijando plazos límite para las distintas fases que lo integran, y del establecimiento, por otro, de nuevas técnicas en el sistema de abono de primeros pagos que posibiliten una reducción sustancial del tiempo que media entre la resolución del expediente y el pago efectivo a los interesados.

Por último, se considera conveniente concretar el contenido de las Unidades de Atención Especializada, creadas con carácter general para todas las Entidades de Seguridad Social en la Resolución de 2 de febrero de 1988, al principio mencionada, en lo que se refiere singularmente a la atención personalizada al solicitante de plazas de Centros y Residencias del INSERSO, facilitándole información periódica sobre la situación de su solicitud en relación con las posibilidades de obtención de plaza en el Centro solicitado.

En razón de lo expuesto, esta Secretaría General para la Seguridad Social, conforme a las competencias conferidas por el artículo 13 del Real Decreto 530/1985, de 8 de abril, resuelve:

Primero.-1. A partir de la fecha de entrada en vigor de la presente Resolución en la tramitación de solicitudes de prestaciones y servicios que a continuación se indican, gestionadas por el Instituto Nacional de Servicios Sociales, se suprime la exigencia con carácter general de que los solicitantes aporten los siguientes documentos:

Comunes a todas las prestaciones y ayudas, con excepción de las reguladas por Real Decreto 383/1984, de 1 de febrero:

Certificado de la condición de minusválido.

Impreso de elección de modalidad de cobro bancario de la prestación.

En la aportación económica por minusvalía, regulada en la Orden de 8 de mayo de 1970:

Certificado médico de las lesiones padecidas por el minusválido.

Documento de afiliación a la Seguridad Social.

Certificado acreditativo de estar percibiendo prestación o subsidio de desempleo.

Certificación de inscripción, en su caso, como demandante de empleo en la Oficina correspondiente.

En las Ayudas Públicas Individuales a Disminuidos, reguladas en Real Decreto 620/1981, de 5 de febrero:

Documento de afiliación a la Seguridad Social.

Declaración jurada sobre ingresos personales o familiares.

Declaración jurada de no percibir otras ayudas.

Prescripción técnica.

Ingresos en Centros y Residencias.

Fotocopia de la declaración de la Renta.

Certificado de la pensión o pensiones.

2. Sin perjuicio de lo dispuesto en el número anterior, las Direcciones Provinciales del Instituto Nacional de Servicios Sociales incorporarán al expediente de que se trate la información relativa a la situación de afiliación a la Seguridad Social del solicitante, incorporando por otra parte al propio modelo de solicitud las declaraciones juradas, que se suprimen como documento independiente.

3. En las prestaciones sociales y económicas de la Ley de Integración Social de los Minusválidos, reguladas por Real Decreto 383/1984, de 1 de febrero, a fin de asimilar su tratamiento al resto de las prestaciones gestionadas por el Instituto Nacional de Servicios Sociales, la información que se venía aportando en las declaraciones que a continuación se indican, se incorporarán al modelo de solicitud, dejando de exigirse como documento independiente:

Declaración jurada de los recursos personales del minusválido y, en su caso, de los recursos de la unidad familiar de la que forma parte.

Declaración jurada sobre si el minusválido está o no comprendido como titular o beneficiario en el Sistema de la Seguridad Social, y sobre si es o no beneficiario o tiene derecho a alguna prestación o ayuda otorgada por otro organismo público.

A su vez y respecto a la certificación que acredite la condición de minusválido, la misma se incorporará de oficio por la propia Dirección Provincial del Instituto Nacional de Servicios Sociales.

Segundo.-En el plazo de un mes, contado a partir de la entrada en vigor de la presente Resolución, el Instituto Nacional de Servicios Sociales deberá establecer un procedimiento administrativo para el trámite de la totalidad de prestaciones económicas cuya gestión tiene encomendada, que responda a los objetivos de simplificación y agilización de la presente Resolución, procediendo al mismo tiempo a la intensificación de los ciclos de emisión de nóminas de primeros pagos de prestaciones, de modo que se produzca un acortamiento efectivo entre la resolución y pago de la prestación.

Tercero.-Trimestralmente, se informará a los solicitantes de plazas en Centros de Minusválidos o Residencias de Tercera Edad de la situación de sus solicitudes, así como de la puntuación mínima necesaria para su ingreso, ofreciendo la posibilidad de que los mismos comuniquen cualquier variación de las circunstancias que pudieran modificar dicha valoración.

Cuarto.-El Director general del Instituto Nacional de Servicios Sociales dictará las instrucciones necesarias para la aplicación y desarrollo de lo dispuesto en la presente Resolución.

Quinto.-La presente Resolución entrará en vigor el día 1 de abril de 1988.

Madrid, 14 de marzo de 1988.-El Secretario general, Adolfo Jiménez Fernández.

Ilmos. Sres. Directores generales de Régimen Jurídico de la Seguridad Social, de Régimen Económico de la Seguridad Social, del Instituto Nacional de Servicios Sociales, de la Tesorería General de la Seguridad Social e Interventor General de la Seguridad Social.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION

7026

REAL DECRETO 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

El 24 de noviembre de 1986 se aprobó la Directiva del Consejo 86/609/CEE, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, que tiene como objeto armonizar la legislación de los distintos Estados miembros de la CEE en lo que se refiere a la protección de los animales utilizados para dichos fines, garantizando al mismo tiempo que el número de animales empleados en este tipo de prácticas se reduzca al mínimo y que, en todo caso, se les conceda un trato que evite al máximo el dolor, el sufrimiento, el estrés o la lesión prolongados innecesariamente y fomentando, asimismo, la puesta a punto de técnicas alternativas que puedan aportar el mismo nivel de información que el obtenido en experimentos con animales y que supongan una menor utilización de éstos.

En la legislación española no existe hasta el presente ninguna normativa legal específica en esta materia, si bien la Real Orden Circular de 31 de julio de 1929, actualizada por Orden del Ministerio de la Gobernación de 1 de marzo de 1961 establece las sanciones a las personas que suministren, sin causa justificada, droga o sustancia nociva a un animal no dañino, o lo sometan a cualquier intervención quirúrgica hecha sin el cuidado o la humanidad debidos, o consientan la administración de aquella o la ejecución de ésta.

Se hace necesario, por tanto, la promulgación de una norma que incorpore al ordenamiento legal español lo dispuesto en la citada Directiva.

En su virtud, a propuesta del Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 11 de marzo de 1988,

DISPONGO:

Artículo 1.º El objeto del presente Real Decreto es asegurar la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos; que a dichos animales se les concedan los cuidados adecuados; que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, estrés o lesión prolongados; que se evite toda duplicación inútil de experimentos y que el número de animales utilizados se reduzca al mínimo.

Art. 2.º La utilización de animales en experimentación sólo podrá tener lugar cuando ésta persiga los siguientes fines:

- a) La prevención de enfermedades, alteraciones de la salud y otras anomalías o sus efectos, así como el diagnóstico y el tratamiento de las mismas en el hombre, los animales vertebrados o invertebrados o las plantas; el desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos y alimenticios y otras sustancias o productos, así como la realización de pruebas para verificar su calidad, eficacia y seguridad.
- b) La valoración, detección, normalización o modificación de las condiciones fisiológicas en el hombre, los animales vertebrados o invertebrados o las plantas.
- c) La protección del medio ambiente natural, en beneficio de la salud o bienestar del hombre, los animales vertebrados o invertebrados o las plantas.
- d) La investigación científica.
- e) La educación y la formación.
- f) La investigación médico-legal.

Art. 3.º A efectos del presente Real Decreto, se entenderá por:

- a) «Animal» sin otro calificativo: Cualquier ser vivo vertebrado no humano, incluidas las formas larvares autónomas capaces de reproducirse, con exclusión de formas fetales o embrionarias.
 - b) «Animales de experimentación»: Los animales utilizados o destinados a ser utilizados en experimentos.
 - c) «Animales de cría»: Los animales especialmente criados para su utilización en experimentos en establecimientos registrados por la autoridad competente.
 - d) «Experimentos»: Toda utilización de un animal con fines experimentales u otros fines científicos que pueda causarle dolor, sufrimiento, estrés o lesión prolongados, incluida toda actuación que de manera intencionada o casual pueda dar lugar al nacimiento de un animal en las condiciones anteriormente mencionadas. Quedan excluidos los métodos admitidos en la práctica moderna (métodos humanitarios) para el sacrificio e identificación de los animales. Se entiende que un experimento comienza en el momento en que se inicia la preparación de un animal para su utilización y termina cuando ya no se va a hacer ninguna observación ulterior a dicho experimento. Se considera, asimismo, experimento la utilización de los animales, aun cuando se eliminen el dolor, sufrimiento, lesión o estrés prolongados, mediante el empleo de anestesia, analgesia u otros métodos.
- Quedan excluidas las prácticas agrícolas no experimentales y las de clínica veterinaria.
- e) «Persona competente»: Cualquier persona que en función de sus conocimientos se encuentre capacitada, al amparo del presente Real Decreto, para realizar las funciones contempladas en el mismo:

Cuidador: Persona con formación acreditada para el adecuado manejo de animales en establecimientos de cría, suministro y usuarios.

Experimentador: Titulado de grado medio o superior que posea una formación específica en protección y experimentación animal.

Responsable o especialista: Titulado superior en Ciencias Experimentales que, además, posea una formación específica de posgrado en protección y experimentación animal.

f) «Autoridad»: Los órganos competentes de las Administraciones Públicas responsables, en cada caso, del cumplimiento de las normas que dicta el presente Real Decreto.

g) «Establecimiento»: Cualquier instalación, edificio o grupo de edificios u otros locales, incluidos excepcionalmente lugares que no estén totalmente cercados o cubiertos, así como instalaciones móviles.

h) «Establecimiento de cría»: Cualquier instalación donde se críen animales para utilizarlos en experimentación.

i) «Establecimiento suministrador»: Cualquier establecimiento que, no siendo de cría, suministre animales para su utilización en experimentación.

j) «Establecimiento usuario»: Cualquier establecimiento en el que los animales se utilicen para experimentación.

k) «Animales de experimentación adecuadamente anestesiados»: Los animales privados de sensaciones mediante el empleo de anestesia, local o general.

l) «Sacrificio por métodos humanitarios»: El sacrificio de un animal con el menor sufrimiento físico y psíquico, de acuerdo con su especie.

Art. 4.º 1. Las Comunidades Autónomas, en el ámbito de sus respectivos territorios, serán competentes para el cumplimiento de lo dispuesto en el presente Real Decreto.

A estos efectos, procederán al registro de los establecimientos de cría, suministradores y usuarios, así como a la autorización, en su caso, de la utilización de animales en los experimentos.

Aquellos establecimientos usuarios que críen animales para su uso exclusivo, bastará que se registren como establecimientos usuarios.

2. Quedan excluidos de lo dispuesto en los párrafos anteriores los establecimientos de cría, suministradores y usuarios de titularidad estatal, respecto de los cuales será competente el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para su registro y, en su caso, autorizar la utilización de animales en los experimentos.

3. En todo caso, los establecimientos usuarios vendrán obligados a notificar trimestralmente a la autoridad competente los experimentos que se propongan realizar.

Art. 5.º Las Comunidades Autónomas, a los fines de la protección de los animales, comunicarán trimestralmente al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación los datos registrales de los establecimientos, con mención expresa de su nombre y dirección, tipo de establecimiento, descripción, capacidad, especies y número de animales que se críen, suministren o utilicen, según proceda, y nombre y titulación de la persona competente; los experimentos realizados, con una descripción de los aspectos fundamentales de los mismos, especies y número de animales utilizados, destino final de los mismos y, en su caso, método de sacrificio humanitario utilizado, así como excepciones concedidas en el ámbito de sus respectivas competencias.

Art. 6.º 1. Los establecimientos de cría y los establecimientos suministradores estarán obligados a tener:

a) Un libro de registro de entradas, en el que se anotarán el número y las especies de animales adquiridos, con indicación de su procedencia, o nacidos en el propio establecimiento, con indicación de la fecha en ambos casos.

b) Un libro de registro de salidas, en el que se anotarán el número y las especies de animales vendidos o suministrados, la fecha de venta o de suministro, el nombre y la dirección del destinatario y el número y las especies de los animales muertos durante su estancia en el establecimiento de cría, o en el establecimiento suministrador en cuestión.

Dichos registros se conservarán durante, al menos, tres años a partir de la fecha de la última inscripción y estarán sometidos a inspección periódica a cargo de la autoridad competente.

2. Los establecimientos suministradores sólo podrán obtener animales a partir de establecimientos de cría, de otros establecimientos suministradores o de importaciones procedentes de estas categorías de establecimientos debidamente autorizados en el país de origen. Las excepciones a esta norma sólo podrán ser acordadas por la autoridad competente.

3. Los establecimientos usuarios estarán obligados a tener un libro de registro en el que quede constancia de todos los animales utilizados, así como del número y especies de animales adquiridos y establecimientos de adquisición y el destino final de aquéllos, una vez finalizado el experimento. Este registro deberá conservarse, al menos, tres años a partir de la fecha de la última inscripción y estará sometido a inspección periódica a cargo de la autoridad competente.

4. En el correspondiente libro de registro de cada establecimiento deberán incluirse los detalles particulares relativos a la identidad y origen de todo perro, gato o primate no humano, de acuerdo con lo establecido en el artículo 9.º

5. Los establecimientos usuarios sólo podrán utilizar animales de las especies enumeradas en el anexo I del presente Real Decreto, procedentes de establecimientos de cría o suministradores. No se utilizarán en los experimentos, animales vagabundos de las especies domésticas. Las excepciones a esta norma sólo podrán ser concedidas con carácter particular por la autoridad competente.

Art. 7.º Para que los establecimientos contemplados en el presente Real Decreto puedan ser registrados deberán cumplir los siguientes requisitos en orden al cuidado general y alojamiento de los animales de experimentación:

a) Que a los animales se les proporcionen condiciones adecuadas de alojamiento, medio ambiente, alimentación y bebida, así

como cierto grado de libertad de movimientos y se limite al mínimo preciso cualquier restricción que les impida satisfacer sus necesidades fisiológicas y etológicas; estas condiciones deberán verificarse diariamente.

b) Que el bienestar y estado de salud de los animales sean supervisados por una persona competente con titulación superior.

c) Que se disponga de medios e instalaciones que garanticen la eliminación, en el plazo más breve posible, de cualquier deficiencia que provoque alteraciones en el estado de salud o bienestar de los animales; las normas de trabajo e instrucciones de uso de todos los elementos constarán por escrito.

Art. 8.º 1. Los establecimientos usuarios deberán disponer de instalaciones y equipo, tanto humano como material, apropiados a las especies a utilizar y a los experimentos a realizar, garantizando que los mismos puedan ejecutarse con la mayor efectividad posible, de forma que se obtengan los resultados perseguidos con el menor número posible de animales y produciendo a los mismos el mínimo grado de dolor, sufrimiento, estrés o lesión prolongados. Al frente del establecimiento deberá haber una persona responsable administrativamente del cuidado de los animales y del funcionamiento del equipo.

2. Asimismo, deberá contarse con asesoramiento veterinario para el control de todos los aspectos relacionados con la salud de los animales y con un Veterinario u otra persona competente para cuidar del bienestar de los animales.

Art. 9.º 1. En los establecimientos de cría, suministradores o usuarios, a todo perro, gato o primate no humano, se le deberá dotar, antes de su destete, de una marca de identificación individual realizada de forma que le cause el menor daño posible.

2. Cuando un perro, gato o primate no humano sea trasladado de un establecimiento a otro de los que se citan en el apartado anterior, antes de su destete, y no haya sido posible identificarlo previamente, el establecimiento receptor deberá conservar un registro documental completo, con identificación, en particular, de los datos de la madre, hasta que sea identificado.

Art. 10. Quedan prohibidos los experimentos en los que se utilicen animales considerados en peligro de extinción, que figuran en el apéndice I del Convenio de Washington de 3 de marzo de 1973, sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, modificado el 22 de octubre de 1987; en el anexo C, parte 1, del Reglamento (CEE) número 3626/1982, modificado por el Reglamento (CEE) número 3143/1987 y en los Reales Decretos 3181/1980 y 1497/1986, a menos que se ajusten a lo dispuesto en las normativas citadas y los objetivos del experimento sean: La investigación tendente a la protección de las especies de que se trate o fines biomédicos esenciales, cuando se compruebe que tales especies son excepcionalmente las únicas adecuadas a tales fines.

La apreciación de estas excepciones y la autorización, en su caso, corresponderá a la autoridad competente, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 4.º, a solicitud del establecimiento usuario, que la acompañará de una memoria descriptiva del experimento y objetivos que se persigan con el mismo.

Art. 11. 1. Los experimentos sólo podrán realizarse por personas competentes (experimentador, responsable o especialista) o bajo la responsabilidad directa de las mismas.

2. No deberá realizarse un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio y contrastado que permita obtener las mismas conclusiones, sin implicar la utilización de animales.

Ante la elección entre diversos experimentos, se seleccionarán aquellos que permitan obtener los resultados más satisfactorios y que: a) Utilicen el menor número de animales; b) Se trate de animales con el menor grado de sensibilidad neurofisiológica; y c) Causen el menor dolor, sufrimiento, estrés o lesión prolongados.

3. No podrán llevarse a cabo experimentos con animales salvajes o vagabundos, a menos que los realizados con otros animales no permitan alcanzar los objetivos perseguidos por el experimento.

4. Excepcionalmente y previa autorización de la autoridad competente podrán llevarse a cabo experimentos fuera de los establecimientos usuarios.

Art. 12. 1. Los experimentos deberán llevarse a cabo con anestesia general o local, salvo que se considere que ésta:

- Es más traumática para el animal que el experimento en sí.
- Es incompatible con los fines del experimento.

Cuando se prevea que en un experimento se van a dar alguna de las dos circunstancias reseñadas en el párrafo anterior y con objeto de garantizar que no se realice innecesariamente, se mencionará expresamente en la notificación a la autoridad competente prevista en el artículo 4.º, para que ésta autorice el experimento.

2. Sin perjuicio de lo dispuesto en el apartado anterior, cuando se dé alguna de las excepciones previstas en el mismo,

deberán utilizarse analgésicos u otros métodos idóneos para garantizar, en la medida de lo posible, que el dolor, el sufrimiento, el estrés o la lesión sean mínimos.

3. Siempre que sea compatible con los fines del experimento, un animal que vaya a sufrir dolor intenso y prolongado después de haberse recuperado de la anestesia, deberá ser tratado a tiempo, con medios adecuados para calmar el dolor o, cuando esto no sea posible, deberá ser sacrificado inmediatamente por métodos humanitarios.

Art. 13. 1. Al término de todo experimento habrá de decidirse si el animal debe mantenerse con vida o ser sacrificado mediante un método humanitario. En todo caso, no se conservará con vida a un animal si, habiendo recuperado la salud en todos los demás aspectos, es probable que padezca un dolor o sufrimiento duraderos. A este respecto, tales decisiones serán adoptadas por el responsable del experimento.

2. Cuando al término de un experimento:

a) Se vaya a conservar con vida a un animal, éste deberá recibir el cuidado adecuado a su estado de salud, ser sometido a la vigilancia de un Veterinario y mantenido en condiciones acordes con las exigencias del artículo 7.º.

Sin perjuicio de las demás disposiciones del presente Real Decreto, cuando sea necesario para los fines del experimento, la autoridad competente podrá autorizar que un animal utilizado en experimentación sea devuelto a su medio habitual, adoptándose las medidas adecuadas para salvaguardar el bienestar del mismo, en la medida en que su estado de salud lo permita y no entrañe riesgo para la salud pública ni el medio ambiente.

b) Se decida no conservar con vida a un animal, éste deberá ser sacrificado lo antes posible, mediante un método humanitario.

Art. 14. En todo experimento en que los animales puedan sufrir un intenso dolor, el responsable del experimento deberá presentar ante la autoridad competente una memoria justificativa, con una antelación mínima de treinta días al inicio del experimento, donde se haga constar la especie y el número de animales a utilizar, así como la inexistencia de procedimientos alternativos. La autoridad competente autorizará, si procede, dicho experimento.

En ningún caso podrá utilizarse un animal más de una vez en experimentos que conlleven un dolor, estrés o sufrimiento intensos.

Art. 15. Por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación se publicará anualmente la información recibida de las Comunidades Autónomas, relativa a la utilización de animales en experimentación, con las cauciones necesarias para garantizar la salvaguardia del carácter confidencial de las informaciones que presenten un interés comercial particular.

DISPOSICION ADICIONAL

Los criterios establecidos en el anexo II de la Directiva del Consejo 86/609/CEE, relativos al alojamiento y cuidados de los animales, deberán tenerse en cuenta en todo experimento con animales y en los establecimientos relacionados con los mismos.

DISPOSICIONES TRANSITORIAS

Primera.-Transcurrido un plazo de dieciocho meses, contado desde la entrada en vigor del presente Real Decreto, será imprescindible tener inscrito en el correspondiente registro, el establecimiento de cría, suministrador o usuario, para el ejercicio de su actividad.

Segunda.-Todo experimento, para poder ser realizado, deberá ajustarse a lo expuesto en el presente Real Decreto, una vez transcurridos dieciocho meses, contados desde su entrada en vigor.

DISPOSICIONES ADICIONALES

Primera.-Se faculta al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para dictar normas en desarrollo del presente Real Decreto.

Segunda.-El presente Real Decreto entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 14 de marzo de 1988.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación,
CARLOS ROMERO HERRERA

ANEXO

Ratón.	Mus musculus.
Rata.	Rattus norvegicus.
Cobaya.	Cavia porcellus.
Hamster dorado.	Mesocricetus auratus.
Conejo.	Oryctolagus cuniculus.
Primates no humanos.	
Perro.	Canis familiaris.
Gato.	Felis catus.
Codorniz.	Coturnix coturnix.

7027 *REAL DECRETO 224/1988, de 14 de marzo, por el que se modifican y complementan las normas de ordenación sobre construcción y modernización de buques pesqueros establecidas en los Reales Decretos 219/1987, de 13 de febrero; 535/1987, de 10 de abril, y 872/1987, de 12 de junio.*

Una vez aprobado por la Comisión de la CEE, con fecha 11 de diciembre de 1987, el Programa de Orientación Plurianual 1987-1991 para la flota pesquera española, procede tener en cuenta los objetivos señalados en el mismo y alcanzar un mayor nivel de ajuste entre los recursos disponibles y la capacidad y el esfuerzo pesquero nacional. Con este fin, el presente Real Decreto modifica el artículo 4.º del Real Decreto 219/1987, de 13 de febrero, y el artículo 2.º del Real Decreto 535/1987, de 10 de abril, en lo que se refiere a la aportación de bajas para nuevas construcciones. Al mismo tiempo establece una norma complementaria de ordenación en el caso de las obras de modernización de buques pesqueros con el fin de evitar un aumento indiscriminado de la potencia propulsora de los mismos y de cumplir a la vez los referidos objetivos del Programa de Orientación Plurianual.

Asimismo, las normas de ordenación contenidas en el Real Decreto 872/1987, de 12 de junio, se complementan en lo relativo al incremento de la potencia propulsora y a las bajas necesarias de dicho factor para su autorización.

En su virtud, a propuesta del Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación, previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 11 de marzo de 1988,

DISPONGO:

Artículo 1.º El apartado b), primera frase, del artículo 4.º del Real Decreto 219/1987, de 13 de febrero, para el desarrollo y la adaptación de las estructuras del sector pesquero y de la acuicultura, y el apartado b), primera frase, del artículo 2.º del Real Decreto 535/1987, de 10 de abril, sobre construcción de buques pesqueros de seis o más metros de eslora entre perpendiculares y ayudas complementarias en materia de estructuras del sector pesquero y de la acuicultura, quedan redactados de la forma siguiente:

«b) Que las bajas representen, como mínimo, el 100 por 100 de la potencia y del tonelaje de registro bruto de la nueva construcción.»

Art. 2.º Se establece la siguiente norma de ordenación de carácter básico como requisito adicional a los establecidos en el artículo 1.º del Real Decreto 872/1987, de 12 de junio:

«Los cambios de motor y cualquier obra que incremente la potencia propulsora del buque darán lugar a la aportación obligatoria de bajas equivalentes en cuanto a dicho factor potencia, que deberán pertenecer al mismo censo y caladero cuando el aumento sea superior al 15 por 100. En su caso, y exclusivamente en los cambios de motor, podrá autorizarse el tarado del nuevo motor con una reducción de hasta el 20 por 100 de su potencia máxima.»

Art. 3.º Se entenderá por potencia propulsora la potencia máxima al freno, medida a la salida del motor propulsor (potencia BHP).

DISPOSICIONES FINALES

Primera.—Se faculta al Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación para poder incrementar los mínimos del 100 por 100 de aportación de bajas en términos de tonelaje y de potencia, hasta un máximo del 150 por 100, de conformidad con el grado progresivo de cumplimiento de los objetivos del Programa de Orientación Plurianual previsto en el artículo 2.º del Reglamento (CEE) 4028/1986.

Segunda.—Se faculta al Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación para dictar, en el ámbito de su competencia, las normas necesarias para el cumplimiento y desarrollo del presente Real Decreto.

Tercera.—El presente Real Decreto entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 14 de marzo de 1988.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación,
CARLOS ROMERO HERRERA

7028 *CORRECCION de errores del Real Decreto 157/1988, de 22 de febrero, por el que se establece la normativa a que deben ajustarse las denominaciones de origen y las denominaciones de origen calificadas de vinos y sus respectivos Reglamentos.*

Advertidos errores en el texto del mencionado Real Decreto, publicado en el «Boletín Oficial del Estado» número 47, de fecha 24 de febrero de 1988, páginas 5864 a 5866, se transcriben a continuación las oportunas rectificaciones:

En la página 5864, en el tercer párrafo del preámbulo, séptima línea, donde dice: «determinads», debe decir: «determinadas».

En la página 5865, artículo 2.º, primera línea, donde dice: «de orgien», debe decir: «de origen».

En la página 5865, artículo 8.º, párrafo cuarto, primera línea, donde dice: «2.a) En caundo ...», debe decir: «2.a) En cuanto ...».

En la página 5865, artículo 8.º, 2.a), décima y undécima líneas, donde dice: «proceso de mixto de», debe decir: «proceso mixto de ...», y donde dice: «del vinos en envases», debe decir: «del vino en envases».

En la página 5865, en el artículo 9.º.1, segunda línea, donde dice: «con la gduación», debe decir: «con la graduación».

En la página 5866, en el artículo 17, primer párrafo, cuarta línea, donde dice: «... lo establecido ...», debe decir: «... a lo establecido ...».

En la página 5866, en el artículo 19.1, apartado a), primera línea, donde dice: «Que de las uvas de que ...», debe decir: «Que las uvas de que ...».

En el artículo 19.1, apartado c), cuarta línea, donde dice: «precentas», debe decir: «precintas».

MINISTERIO DE TRANSPORTES, TURISMO Y COMUNICACIONES

7029 *ORDEN de 10 de marzo de 1988 sobre suministro de combustible de uso en aviación civil.*

El combustible de uso en aviación civil requiere un gran cuidado, tanto en el mantenimiento de su calidad como en la manipulación del mismo, debido a su propia naturaleza.

Por otra parte, con la entrada de España en la Comunidad Económica Europea se ampliará en gran medida el número de Compañías suministradoras que operan en España. Por ello, se hace necesario dictar unas instrucciones que, sin detrimento de las que particularmente tienen establecidas las Compañías suministradoras, engloben unas medidas generales de seguridad a cumplir por todas ellas, de acuerdo con lo dispuesto en la Ley de Navegación Aérea de 21 de julio de 1960, en sus artículos 39 a 47 y 142; la Ley de 2 de noviembre de 1940, de Clasificación y Régimen de Aeropuertos, con la Orden de 8 de abril de 1941 que la desarrolla; el Real Decreto-ley 22/1982, de 7 de diciembre; el Real Decreto 990/1979, de 4 de abril, y de la Orden número 579/1973, de 28 de febrero, por los que viene atribuida al Ministerio de Transportes, Turismo y Comunicaciones la competencia de dictar normas en esta materia en el ámbito de la Red de Aeropuertos Nacionales y de los Organismos oficiales y Entidades dependientes del Ministerio, en su virtud dispongo:

Primero.—Las Compañías suministradoras son las únicas responsables de la calidad del producto que suministren y de la manipulación del mismo hasta su entrega al usuario en el ámbito de la Red de Aeropuertos Nacionales y de los Organismos oficiales y Entidades dependientes del Ministerio de Transportes, Turismo y Comunicaciones. Para poder operar en dicho ámbito, la Compañía suministradora deberá contar con la autorización del Ministerio de Transportes, Turismo y Comunicaciones sin detrimento de las que precisen de otros Organismos.

La inscripción en el Registro General, practicada en virtud de la comunicación a que se refiere el artículo anterior, dará fe del alcance de su reconocimiento a todo el territorio español.

Esta inscripción será publicada por el Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo en el «Boletín Oficial del Estado».

Art. 18. *Seguimiento de las condiciones técnicas de la acreditación.*—Durante la vigencia de la acreditación se realizarán las siguientes actuaciones:

Inspecciones por el Organismo acreditador, al menos una vez al año, para comprobar que en el laboratorio se mantienen las condiciones para las que fue acreditado, levantándose la correspondiente acta.

Ensayos periódicos de contraste con laboratorios patrón con la participación del laboratorio acreditado.

Cuando se observe alguna anomalía en el funcionamiento del laboratorio, el Inspector la reflejará en acta, señalando el plazo en el que deberá ser subsanada. Durante este plazo el Inspector podrá determinar las medidas cautelares siguientes:

Precinto de máquinas.

Suspensión de realización de determinados ensayos.

Art. 19. *Cancelación de la acreditación.*—La acreditación de un laboratorio puede cancelarse en los siguientes supuestos:

a) A petición propia del laboratorio.

b) Cuando sea declarado en quiebra.

c) Cuando deje de cumplir alguna de las condiciones a las que se refiere el artículo 18.

Si se propusiese la cancelación de la acreditación se tramitará según lo dispuesto en la Ley de Procedimiento Administrativo, garantizando la audiencia al interesado. La cancelación será notificada a la Dirección General para la Vivienda y Arquitectura para su baja en el Registro y publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Art. 20. *Renovación de la acreditación.*—La renovación de una acreditación deberá solicitarse al Organismo acreditador seis meses antes de expirar el plazo de vigencia.

La resolución del Organismo acreditador concediendo o denegando la renovación se comunicará a la Dirección General para la Vivienda y Arquitectura del Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo para su toma de razón en el Registro, o, en su caso, para su baja en el mismo. La Dirección General lo comunicará a la Comisión Técnica de Acreditación para su conocimiento.

CAPÍTULO IV. LABORATORIO PATRÓN

Art. 21. *Funciones del laboratorio patrón.*—Son funciones de un laboratorio patrón:

Realizar los ensayos de contraste en la concesión, seguimiento y renovación de las acreditaciones.

Realizar los ensayos de contraste que determine la Comisión Técnica de Acreditación, con el conjunto de laboratorios patrón de su área.

Estar representado en las Subcomisiones Técnicas del área de acreditación correspondiente.

Cuantas otras funciones le sean encomendadas por la Comisión Técnica de Acreditación.

Art. 22. *Condiciones de un laboratorio patrón.*—Puede ser laboratorio patrón para un área técnica de acreditación aquel que, dependiente de una Administración Pública, cuente con medios personales y materiales, a juicio de la Comisión Técnica de Acreditación, para garantizar la máxima fiabilidad en la realización de los ensayos comprendidos en el área técnica.

En casos excepcionales la Comisión Técnica de Acreditación podrá designar algún laboratorio que no pertenezca a una Administración Pública, siempre que quede garantizada la independencia de su actuación.

Art. 23. *Designación de los laboratorios patrón.*—Al establecer un área de acreditación se designará por la Comisión Técnica, a propuesta de las Comunidades Autónomas y/o de la Administración del Estado, al menos, un laboratorio patrón para dicho área técnica.

Art. 24. *Cese como laboratorio patrón.*—Un laboratorio patrón puede cesar de actuar como tal cuando así sea solicitado por el propio laboratorio o cuando lo juzgue la Comisión Técnica de Acreditación, que notificará al laboratorio en un informe razonando las causas, adoptándose el cese en resolución motivada, previa audiencia del laboratorio.

CAPÍTULO V. COSTOS DE LA ACREDITACIÓN

Art. 25. *Abono de los gastos de acreditación.*—Los gastos ocasionados como consecuencia de la solicitud, así como los de seguimiento y renovación, deberán ser satisfechos por el laboratorio peticionario o beneficiario, de acuerdo con la normativa vigente aplicable al Organismo que haya realizado las actuaciones.

Los ensayos de contraste serán satisfechos directamente al laboratorio patrón por el laboratorio peticionario o acreditado.

Los ensayos de contraste entre laboratorios patrón no devengarán derecho alguno.

La Comisión Técnica de Acreditación propondrá a las Administraciones actuantes unos costos de referencia, con objeto de evitar las posibles desigualdades que puedan producirse.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

24365 *ORDEN de 13 de octubre de 1989 por la que se establecen las normas de registro de los establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación de titularidad estatal, así como las de autorización para el empleo de animales en experimentos, en desarrollo del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo.*

El Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, establece, en su artículo 4.º, punto 2, que respecto al registro y en su caso autorización de los animales en experimentación, en los establecimientos de cría, suministradores y usuarios de titularidad estatal, será competente el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Corresponde al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación determinar las exigencias que en el ámbito del mencionado Real Decreto han de cumplir dichos establecimientos y actividades, establecer el registro oficial de los mismos, así como el procedimiento de notificación de experimentos y de solicitud de autorización de cuantos experimentos así lo requieran. A tal fin y para poder dar cumplimiento a lo establecido en el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, y en uso de las facultades que en él mismo se me confieren, dispongo:

Artículo 1.º La presente Orden tiene por finalidad establecer las normas de registro de los establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación de titularidad estatal así como el procedimiento de notificación de experimentación y de solicitud y autorización de empleo de dichos animales en los experimentos que así lo requieran.

A efectos de aplicación de la presente Orden se tendrán en cuenta las definiciones establecidas en el artículo 3.º del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo.

Art. 2.º Todo establecimiento de cría, suministrador y usuario de animales de experimentación de titularidad estatal, deberá inscribirse en el Registro habilitado a tal efecto en este Departamento, a través de la Dirección General de la Producción Agraria.

Art. 3.º Los Departamentos ministeriales y Organismos autónomos titulares de los mencionados establecimientos presentarán en la correspondiente Dirección Territorial o Provincial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación una solicitud dirigida al Director general de la Producción Agraria, a la que se adjuntarán, además de los datos generales del establecimiento:

a) Proyecto conteniendo Memoria descriptiva y planos o croquis de situación y distribución de las construcciones, instalaciones, dependencias y sus accesos, así como la capacidad de alojamiento de las mismas por especies animales.

b) Informe técnico-sanitario relativo a las exigencias contempladas en el artículo 7.º, a), b) y c), del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo así como en el anexo II de la Directiva del Consejo 86/609/CEE, suscrito por la persona competente con titulación superior responsable de la supervisión del estado de salud y bienestar de los animales.

Art. 4.º A la recepción de la solicitud, y en aplicación de las normas establecidas por el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, la Dirección General de la Producción Agraria ordenará visita de inspección a través de la correspondiente Dirección Territorial o Provincial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

A la vista del expediente y el informe emitido por la correspondiente Dirección Territorial o Provincial, la Dirección General de la Producción Agraria podrá proceder a la inscripción en el Registro oficial de dicha actividad, poniendo tal hecho en conocimiento del solicitante y de la Dirección Territorial o Provincial afectada. De observarse deficiencias que impidan la inscripción en el Registro la Dirección General de la Producción Agraria se lo hará saber al solicitante y a la Dirección Territorial o Provincial.

Art. 5.º Los establecimientos usuarios, de titularidad estatal, notificarán trimestralmente a la Dirección General de la Producción Agraria

del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación los experimentos que se propongan realizar, de acuerdo con el modelo que figura en el anexo I.

Art. 6.º Cuando se pretenda realizar algún experimento incurso en alguno de los supuestos contemplados en los artículos 6.º, 5; 10, 11, 4; 12, 1; 13, 2, a), y 14, del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, se solicitará autorización a la Dirección General de la Producción Agraria mediante la cumplimentación del impreso cuyo modelo figura en el anexo II. La Dirección General de la Producción Agraria comunicará al establecimiento la autorización o denegación de la excepción, según proceda, en un plazo máximo de quince días hábiles, a partir de aquel en que haya tenido entrada la mencionada solicitud.

Art. 7.º La Dirección General de la Producción Agraria, en colaboración con las Direcciones Territoriales o Provincial donde radique el establecimiento, podrá proceder a la inspección y comprobación del cumplimiento de los requisitos establecidos por el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, y de la presente Orden, así como la supervisión y control del mantenimiento de los programas de bienestar y sanidad animal.

Caso de comprobarse el incumplimiento de los mencionados requisitos podrá cancelarse o suspenderse la vigencia de la inscripción en el Registro oficial.

Art. 8.º Se faculta al Director general de la Producción Agraria para dictar las disposiciones complementarias para el desarrollo y cumplimiento de la presente Orden.

DISPOSICION FINAL

La presente Orden entrará en vigor el día siguiente a su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Madrid, 13 de octubre de 1989.

ROMERO HERRERA

Ilmo. Sr. Director general de la Producción Agraria.

ANEXO I

Modelo de notificación trimestral de experimentos a realizar, de acuerdo con el artículo 5.º de la presente Orden

Trimestre notificado:
Denominación del establecimiento:
Calle: Número teléfono:
Localidad: Provincia:
Denominación del/de los experimentos a realizar (con inclusión de período de tiempo aproximado de duración y de las especies y número de animales a emplear en cada experimento):

Responsable o especialista del/de los experimentos:

Observaciones:

(Firma y fecha)

El responsable o especialista
del/de los experimentos.

ANEXO II

Modelo de solicitud de autorización expresa de experimentos, de acuerdo con el artículo 6.º de la presente Orden, a cumplimentar por el responsable o especialista del experimento

(Este impreso constará de una sola hoja)

Número de registro oficial del establecimiento:
Denominación del establecimiento:
Calle: Número teléfono:
Localidad: Provincia:
Denominación del/de los experimentos (con inclusión de período de tiempo aproximado de duración y número de animales a emplear en el/los experimentos):
Supuesto/s artículo/s para el/los que se solicita/n. excepción/es según Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo:
Informe justificativo de la solicitud de autorización expresa, firmado por el responsable del/de los experimentos (en caso de falta de espacio cumplimentarse en hojas aparte. Extensión máxima cinco folios):

(Firma y fecha)

El responsable o especialista
del/de los experimentos.

MINISTERIO DE TRANSPORTES, TURISMO Y COMUNICACIONES

24366

CORRECCION de errores de la Orden de 13 de octubre de 1989 por la que se regulan las condiciones, procedimiento y plazos para la aplicación de las ayudas destinadas a los planes de viabilidad de la Marina Mercante.

Advertido que en la citada Orden, publicada en el «Boletín Oficial del Estado» número 247, de fecha 14 de octubre de 1989, página 32332, se ha omitido el anexo del modelo de formulario a que se refiere el punto 3 del número segundo, se hace la oportuna publicación rectificando la omisión advertida.

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

17344 *REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.*

La Directiva 86/609/CEE del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, tiene como objeto armonizar la legislación de los distintos Estados miembros de la Unión Europea en lo que se refiere a la protección de los animales utilizados para dichos fines. Esta directiva pretende garantizar que el número de animales empleados en este tipo de prácticas se reduzca al mínimo y que, en todo caso, a los que se utilicen, se les conceda un trato que evite al máximo el dolor, el sufrimiento o la lesión, prolongados innecesariamente. Fomenta, asimismo, la puesta a punto de métodos alternativos que puedan aportar el mismo nivel de información que el obtenido en procedimientos con animales y que supongan una menor utilización de estos, conceptos que actualmente se engloban en el «principio de las tres erres» (reducción, refinamiento y reemplazo). En la misma fecha y dada la voluntad de definir y limitar el uso de animales de experimentación para determinados fines como son la investigación científica, la educación y la formación y la investigación médico-legal, los Estados miembros adoptaron la Resolución 86/C 331/02.

La Directiva 86/609/CEE del Consejo se modificó mediante la Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y el Consejo, de 22 de julio de 2003, por la que se crea un Comité de reglamentación para garantizar la coherencia de los anexos de la Directiva 86/609/CEE con la evolución científica y técnica más reciente, así como con los resultados de la investigación en las cuestiones de que tratan. No se considera necesario transponer esta directiva a la normativa nacional, ya que se limita a la creación de un comité de ámbito comunitario.

La Directiva 86/609/CEE del Consejo traspuso al ordenamiento jurídico español por medio del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, desarrollado posteriormente por Orden del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, de 13 de octubre de 1989, por la que se establecen las normas de registro de los establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación de titularidad estatal, así como las de autorización para el empleo de animales en experimentos, en desarrollo del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo.

Por otra parte España ratificó, el 25 de octubre de 1990, el Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos (Estrasburgo, 18 de marzo de 1986), que contiene reglas generales cuyo objetivo es evitar que a los animales a los que dicho convenio les es de aplicación se les cause dolor, sufrimiento o angustia innecesarios, así como la limitación de su utilización favoreciendo el uso de métodos alternativos.

Asimismo, en este marco del Consejo de Europa se adoptaron, en una serie de consultas multilaterales, un conjunto de resoluciones sobre la interpretación de ciertas disposiciones y expresiones del Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, sobre la formación y educación de las personas que trabajan con animales de laboratorio, sobre instalaciones y cuidados a

los animales de laboratorio y sobre adquisición y transporte de estos.

La existencia de diferentes órganos para la valoración de la oportunidad de las prácticas de investigación revela la conveniencia de regularlos como instrumento para lograr los fines enunciados en la mencionada directiva.

La creciente preocupación de la sociedad por la protección de los animales y la calidad de la investigación, en la que la observación, el control, el bienestar, el mantenimiento y el cuidado de los animales que se utilizan en experimentación es un pilar básico, así como los cambios en la legislación y los continuos avances científicos, hacen necesaria la actualización de la normativa vigente.

El artículo 36.2 de la Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal, señala que las condiciones sanitarias básicas que deben cumplir las explotaciones de animales serán las que establezca la normativa vigente, y en su disposición final quinta faculta al Gobierno para dictar las disposiciones precisas para la aplicación y desarrollo de la ley. En este real decreto se desarrolla dicha ley en la medida que afecta a los animalarios como explotaciones.

Por todo lo anterior, se ha considerado la necesidad de adaptar la actual normativa, incluyendo lo nuevo y derogando lo antiguo, y así, en aras de una mayor claridad y seguridad jurídica, se ha determinado la conveniencia de promulgar una nueva norma.

En su tramitación, este real decreto ha sido sometido a consulta de las comunidades autónomas y de las entidades representativas de los intereses del sector.

En su virtud, a propuesta de las Ministras de Agricultura, Pesca y Alimentación, de Educación y Ciencia, de Sanidad y Consumo y de Medio Ambiente, con la aprobación previa del Ministro de Administraciones Públicas, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 7 de octubre de 2005,

DISPONGO:

CAPÍTULO I

Objeto, ámbito de aplicación y definiciones

Artículo 1. *Objeto y finalidad.*

1. El objeto de este real decreto es establecer las normas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

2. Su finalidad es asegurar dicha protección y, en particular, que a los animales utilizados se les concedan los cuidados adecuados; que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o lesión prolongados; que se evite toda duplicación inútil de procedimientos, y que el número de animales utilizados en los procedimientos se reduzca al mínimo, aplicando en lo posible métodos alternativos.

Artículo 2. *Ámbito de aplicación.*

1. Este real decreto se aplica a los animales utilizados en la experimentación y otros fines científicos, así como en la docencia. Es de aplicación en todo el territorio nacional.

2. La utilización de animales en los procedimientos, docencia u otros fines científicos sólo podrá tener lugar cuando esta persiga los siguientes fines:

a) La investigación científica, incluyendo aspectos como la prevención de enfermedades, alteraciones de la salud y otras anomalías o sus efectos, así como su diag-

nóstico y tratamiento en el hombre, los animales o las plantas; el desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos y alimenticios y otras sustancias o productos, así como la realización de pruebas para verificar su calidad, eficacia y seguridad.

b) La valoración, detección, regulación o modificación de las condiciones fisiológicas en el hombre, en los animales o en las plantas.

c) La protección del medio ambiente natural, en interés de la salud o del bienestar del hombre o los animales y mantenimiento de la biodiversidad.

d) La educación y la formación.

e) La investigación médico-legal.

3. Quedan excluidas del ámbito de aplicación de este real decreto las prácticas agropecuarias no experimentales y la clínica veterinaria.

Artículo 3. *Definiciones.*

A los efectos de este real decreto, se entenderá por:

a) Animal: cualquier ser vivo vertebrado no humano, incluidas las crías de vida propia o las formas de cría en reproducción, excluidas las formas fetales o embrionarias.

b) Animales de cría: los animales especialmente criados para su utilización en los procedimientos en establecimientos aprobados o registrados por la autoridad competente.

c) Animales de experimentación: los animales utilizados o destinados a ser utilizados en los procedimientos.

d) Animales de experimentación adecuadamente anestesiados: los animales privados de sensaciones mediante el empleo de métodos efectivos de anestesia, local o general.

e) Centro o establecimiento: toda instalación, edificio, grupo de edificios u otros locales, incluidos aquellos no totalmente cerrados o cubiertos, así como las instalaciones móviles y todo el conjunto de medios personales y materiales organizados por su titular para la cría, el suministro o la utilización de animales de experimentación. Se distinguen:

1.º Centro de cría: cualquier establecimiento donde se crían animales de experimentación.

2.º Centro suministrador: cualquier establecimiento que suministra y mantiene animales de experimentación, no nacidos en el mismo centro.

3.º Centro usuario: cualquier establecimiento en el que se utilicen animales de experimentación.

f) Cercado: zona cerrada con paredes, barrotes o tela metálica, donde se mantienen uno o más animales, y en el que la libertad de movimiento de los animales depende del tamaño del recinto y del grado de ocupación, y que normalmente resulta menos limitada que en una jaula.

g) CITES: Convenio sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. Convenio de Washington, de 3 de marzo de 1973.

h) Compartimento: pequeño recinto de tres lados, generalmente con un comedero y bebedero con separaciones laterales, donde pueden mantenerse atados uno o más animales.

i) Corral: zona cerrada con cercas, paredes, barrotes o tela metálica situada habitualmente en el exterior de los edificios, donde los animales alojados en jaulas o cercados pueden moverse libremente durante determinados periodos de tiempo según sus necesidades fisiológicas y etológicas.

j) Eutanasia o sacrificio por métodos humanitarios: el sacrificio de un animal con el menor sufrimiento físico y mental posible, de acuerdo con su especie y estado.

k) Jaula: receptáculo fijo o móvil cerrado por paredes sólidas y, al menos por un lado, con barrotes o tela

metálica o, en su caso, redes, donde se alojan o transportan uno o más animales.

l) Locales de alojamiento: locales donde se aloja normalmente a los animales, bien para cría y mantenimiento, bien durante la realización de un procedimiento.

m) Persona competente: cualquier persona que, en función de su formación, se encuentre capacitada legalmente, al amparo de este real decreto, para realizar las funciones previstas en él.

n) Procedimiento: toda utilización de un animal para los fines establecidos en el artículo 2 que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongados, incluida toda actuación que de manera intencionada o casual pueda dar lugar al nacimiento de un animal en las condiciones anteriormente mencionadas. Se considera, asimismo, «procedimiento» la utilización de los animales, aun cuando se eliminen el dolor, el sufrimiento, la lesión, la angustia o el daño prolongados, mediante el empleo de anestesia, analgesia u otros métodos. Quedan excluidos los métodos admitidos en la práctica moderna (métodos humanitarios) para el sacrificio y para la identificación de los animales. Se entiende que un procedimiento comienza en el momento en que se inicia la preparación de un animal para su utilización y termina cuando ya no se va a hacer ninguna observación ulterior para dicho procedimiento.

ñ) Transportista: cualquier persona física o jurídica que proceda al transporte de animales de experimentación por cuenta propia, por cuenta de un tercero o mediante la puesta a disposición de un tercero de un medio de transporte destinado al transporte de animales de experimentación, transporte que deberá tener carácter comercial y efectuarse con fines lucrativos.

o) Autoridad competente: los órganos competentes de las comunidades autónomas y los órganos competentes de la Administración General del Estado en sus respectivos ámbitos.

p) Métodos alternativos: aquellas técnicas o estrategias experimentales que cumplen con el «principio de los tres erres» (reducción, refinamiento y reemplazo):

1.º Reducción: estrategia encaminada a utilizar el mínimo número de animales necesario para alcanzar el objetivo propuesto en el procedimiento.

2.º Refinamiento: incluye la mayoría de aquellos procedimientos que afectan a la vida del animal de experimentación y permiten aliviar o reducir el posible dolor o malestar.

3.º Reemplazo: utilización de técnicas alternativas que puedan aportar el mismo nivel de información que el obtenido en procedimientos con animales y que no impliquen la utilización de estos.

CAPÍTULO II

De las condiciones generales y el personal

Artículo 4. *Condiciones generales de alojamiento y manejo.*

1. Los centros o establecimientos previstos en este real decreto deberán cumplir los siguientes requisitos en relación con el cuidado general y alojamiento de los animales de experimentación:

a) Que a los animales se les proporcionen unas condiciones adecuadas de alojamiento, medio ambiente, cierto grado de libertad de movimientos, alimentación, bebida y cuidados que aseguren su salud y bienestar.

b) Que se limite al mínimo imprescindible cualquier restricción que les impida satisfacer sus necesidades fisiológicas y etológicas.

c) Que las instalaciones y las condiciones ambientales en las que se críen, mantengan, custodien o se utilicen los animales de experimentación les garanticen un adecuado nivel de bienestar y que ello se verifique diariamente.

d) Que se disponga de medidas, medios e instalaciones que garanticen la eliminación, en el plazo más breve posible, de cualquier deficiencia que provoque alteraciones en el estado de salud o bienestar de los animales, con las alarmas necesarias.

e) Que las normas de trabajo e instrucciones de uso de todos los elementos consten por escrito.

f) Que tengan previsto por escrito un plan de actuación en caso de emergencia o catástrofe.

g) Que se evite el acceso al interior de las instalaciones de personal no autorizado.

h) Que el bienestar y la salud de los animales sean supervisados por el personal competente definido en el anexo I, para prevenir el dolor, así como el sufrimiento, la angustia o el daño duraderos.

2. Los establecimientos o centros deben cumplir lo establecido en el anexo II, así como la normativa vigente sobre las explotaciones ganaderas que les sea aplicable.

3. Los centros usuarios deben disponer, además, de instalaciones adecuadas para la realización de necropsias, toma de muestras y pruebas sencillas de diagnóstico.

4. El manejo de los animales de experimentación se realizará de acuerdo con el anexo III, sin perjuicio de la normativa vigente en materia de conservación de las especies naturales y de la fauna y flora silvestres.

Artículo 5. *Transporte de los animales.*

1. El transporte de los animales utilizados o destinados a ser utilizados en los procedimientos se ajustará a las condiciones establecidas en las normas vigentes sobre comercio, sanidad y bienestar animal.

2. La documentación que debe amparar, durante el transporte, el traslado de animales utilizados o destinados a ser utilizados en los procedimientos se ajustará a las normas vigentes sobre comercio, sanidad y bienestar animal.

3. Los contenedores de transporte garantizarán la contención de los animales y permitirán, al mismo tiempo, su libertad de movimientos. Los vehículos de transporte dispondrán de un sistema de anclaje, en su caso, para evitar los movimientos bruscos de los contenedores.

4. Si durante la realización de un procedimiento es necesario proceder al traslado de un animal, además de lo establecido en los apartados anteriores, se acompañará de un documento de traslado emitido por el especialista en salud animal del centro de origen, que tendrá una validez de cinco días, donde deberán figurar, como mínimo, los datos que se recogen en el anexo IV. Además, se acompañarán de instrucciones escritas claras sobre el suministro de agua y alimentos, y los cuidados especiales que se dispensarán a los animales durante su transporte.

Artículo 6. *Identificación de los animales.*

1. Todos los animales pertenecientes a especies con sistemas de identificación ya regulados deberán estar identificados conforme la normativa vigente en esta materia. El método de identificación estará concebido de manera que no se pueda falsificar, que sea inviolable, fácilmente legible a lo largo de toda la vida del animal, que no pueda volver a utilizarse y no afecte a su bienestar.

2. Concretamente, los perros, gatos y primates no humanos deberán ser identificados individualmente, preferiblemente antes de su destete, con un sistema permanente realizado de forma que se les cause el menor dolor posible. Cuando un perro, gato o primate no humano sea trasladado de un centro o establecimiento a otro antes de su destete y no sea posible identificarlo previamente, el centro o establecimiento receptor conservará un registro documental completo, en particular, de los datos de la madre, y se procederá a su identificación lo más pronto posible.

3. Cuando el sistema de identificación utilizado pueda producir dolor al animal, se le proporcionará la anestesia o analgesia adecuada.

Artículo 7. *Identificación de animales confinados.*

1. Todas las jaulas o sistemas de confinamiento de animales deberán estar etiquetados y en la etiqueta se consignarán los datos de identificación de los animales allí alojados. A menos que no sea posible por las circunstancias o las características de los animales allí confinados, se especificarán, como mínimo, los datos que se relacionan en el anexo V.

2. En los centros usuarios, esta etiqueta debe, además, en su caso, permitir su relación con el procedimiento en el que el animal esté siendo utilizado.

Artículo 8. *Libro de registro de los animales.*

1. Los centros deben llevar un libro de registro aprobado por la autoridad competente que contendrá, como mínimo, los datos que se fijan en el anexo VI. La autoridad competente determinará el formato de dicho libro de registro, que podrá ser llevado de forma manual o informatizada.

2. El libro de registro debe encontrarse permanentemente en el centro y a disposición de la autoridad competente. El centro deberá conservar este libro de registro durante, al menos, tres años a partir de la fecha de la última inscripción.

Artículo 9. *Personal de los centros.*

1. Las personas que lleven a cabo procedimientos o tomen parte en ellos y las personas que estén al cuidado de animales utilizados en procedimientos, incluyendo las tareas de supervisión, deberán tener la preparación y la formación adecuada, acreditada mediante la posesión de un título académico que haya sido considerado adecuado a estos efectos por la autoridad competente. Este personal estará encuadrado en una de las categorías profesionales descritas en el anexo I.

2. En cada centro se designará una persona responsable del cuidado de los animales y del funcionamiento de los equipos.

3. El responsable del centro se asegurará del cumplimiento de lo dispuesto en el apartado anterior.

4. El responsable del centro se asegurará del cumplimiento de la normativa sobre organismos genéticamente modificados cuando esta sea de aplicación.

Artículo 10. *Personal asesor.*

1. Los centros dispondrán de personal especialista en bienestar animal y en salud animal.

2. El responsable de la salud de los animales será un veterinario con formación complementaria especializada en animales de experimentación.

3. Las siguientes funciones podrán ser asumidas tanto por el responsable en salud animal como por el responsable en bienestar animal:

a) Supervisar las instalaciones, el bienestar, el manejo y el cuidado de los animales, con el fin de detectar cualquier deficiencia existente.

b) Si decide al final de un procedimiento que el animal no se sacrifica, supervisar que reciba los cuidados adecuados a su estado de salud bajo control de un especialista en salud animal.

c) En general, de todas las tareas de asesoramiento en materia de bienestar animal, con el fin de prevenir en todo momento el dolor, el sufrimiento, la angustia o daños perdurables a los animales.

CAPÍTULO III

De los centros

Artículo 11. *Obligaciones de los centros.*

1. Los centros suministradores sólo podrán obtener animales a partir de centros de cría o de centros suministradores, a no ser que el animal haya sido legalmente importado y no sea salvaje o vagabundo, salvo autorización expresa de la autoridad competente.

2. Los centros usuarios, siempre que sea posible, deberán utilizar animales de cría. Sin embargo, también podrán utilizar animales procedentes de establecimientos suministradores, de otro centro usuario que los haya cedido como parte del intercambio científico o criados para su uso en sus propias instalaciones. En este último caso, deberán cumplir, además, lo dispuesto en este real decreto para los centros de cría. Se prevén las siguientes excepciones:

a) Los animales de las especies enumeradas en el anexo VII únicamente podrán ser animales de cría, a menos que no sea posible disponer de estos, y previa autorización de la autoridad competente.

b) Los animales de especies diferentes a las enumeradas en el anexo VII deberán ser animales de cría o bien proceder de establecimientos suministradores, a menos que se compruebe que no es posible disponer de estos, y previa autorización de la autoridad competente.

3. Los centros usuarios tendrán las instalaciones y el equipo apropiado para las especies de animales que se utilicen y para la ejecución de los procedimientos que allí se lleven a cabo; su proyecto, construcción y funcionamiento deberán garantizar que los procedimientos puedan ejecutarse con la mayor efectividad posible, de forma que se obtengan resultados coherentes con el menor número posible de animales y se produzca a los animales el mínimo grado de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero.

Artículo 12. *Registro de los centros de cría, suministradores y usuarios.*

1. Los centros o establecimientos privados, con carácter previo al inicio de su funcionamiento, deberán ser autorizados por la autoridad competente.

2. Una vez obtenidos todos los permisos, autorizaciones o licencias exigibles por la normativa vigente, ningún nuevo establecimiento podrá iniciar su actividad sin estar registrado y haber recibido el correspondiente código de identificación.

3. Los centros o establecimientos públicos, con carácter previo al inicio de su funcionamiento, deberán ser inscritos en el registro habilitado para ello.

4. Se crea en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación el Registro de los centros de cría suministradores y usuarios de animales de experimentación, de carácter público e informativo, en el cual se inscribirá directamente todo centro o establecimiento de titularidad estatal.

5. Las comunidades autónomas comunicarán a dicho ministerio los datos que se enumeran en el anexo VIII, referidos a los centros previstos en los apartados 1 y 2, para su traslado a dicho registro.

Artículo 13. *Estructura del registro.*

1. El registro de cada uno de los centros constará como mínimo de los siguientes datos: nombre del centro; dirección completa; titular del centro (nombre y, si procede, razón social y número de CIF o NIF); tipo de establecimiento (cría, suministrador, usuario); código de registro; especies animales que se mantienen en él, y responsable.

2. Se asignará un código de registro a cada centro que estará compuesto por las letras «ES», que identifica a España, seguido de un código numérico compuesto de 12 caracteres, de los que dos corresponderán a la identificación de la provincia, según la codificación del Instituto Nacional de Estadística; tres, a la identificación del municipio, según la codificación de dicho Instituto, y siete, a la identificación del centro. Este último código permitirá identificar al centro de forma única dentro del municipio.

3. Cuando un establecimiento ya se encuentre registrado según el Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas, mantendrá ese código de registro, si bien deberá incluirse también en el registro establecido en el artículo 12 de este real decreto.

4. No se registrarán como centros diferentes las unidades de aquellos centros que estén integrados por unidades independientes entre sí físicamente, a menos que tengan un funcionamiento y una organización independientes.

5. Cuando un centro simultanee actividades de cría, suministro o usuario de animales de experimentación, en el registro se incluirán todas y cada una de ellas, aunque cuando un establecimiento usuario críe animales para su uso en sus propias instalaciones, solo será necesario que se registre como establecimiento usuario, si bien cumplirá también con todas las exigencias establecidas en este real decreto para los centros de cría.

Artículo 14. *Inscripción en el registro del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.*

1. Para su inscripción en el registro del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, los responsables de los centros de titularidad estatal deben dirigir su solicitud a la Dirección General de Ganadería, acompañada de la documentación que se indica en el anexo IX.

2. Cualquier modificación de los datos que figuren inscritos, derivada de ampliaciones, de reducciones, de traslados, de cambios del personal responsable u otras circunstancias, así como en el caso de suspensión o cese de la actividad o de cambio de titularidad, deberá ser notificada al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en el plazo máximo de un mes desde que se haya producido, para que se efectúe la correspondiente modificación en el registro.

Artículo 15. *Base de datos de centros de animales de experimentación.*

A los efectos informativos, se constituirá una base de datos de los centros o establecimientos en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación con las característi-

cas que figuran en el anexo X. Esta base de datos se nutrirá de las comunicaciones que realicen las comunidades autónomas y el propio ministerio y constará, para cada centro, como mínimo, de los datos que figuran en el anexo VIII.

CAPÍTULO IV

De los procedimientos

Artículo 16. *Condiciones generales de los procedimientos.*

1. No deberá realizarse un procedimiento, si se dispone de otro método científicamente satisfactorio y contrastado, que permita obtener el resultado perseguido sin implicar la utilización de animales, excepto cuando la normativa de aplicación lo requiera.

2. Los procedimientos deberán realizarse de forma que eviten la angustia y el dolor o el sufrimiento innecesario a los animales de experimentación.

3. Para evitar duplicaciones innecesarias de procedimientos que tengan como fin cumplir las disposiciones de las legislaciones nacionales o comunitarias en materia de salud y seguridad, las autoridades competentes deberán reconocer, en la medida de lo posible, la validez de los datos obtenidos mediante los procedimientos llevados a cabo en el territorio comunitario, a no ser que alguna prueba posterior sea necesaria para la protección de la salud pública y la seguridad.

4. Las autoridades competentes deben fomentar la investigación sobre el desarrollo y la confirmación de técnicas alternativas que puedan aportar el mismo nivel de información que el obtenido en procedimientos con animales, que supongan el uso de menos animales o que impliquen procedimientos menos dolorosos.

5. Ante la elección entre diversos procedimientos, se seleccionará aquel que permita obtener los resultados más satisfactorios y que:

- a) Utilice el menor número de animales.
- b) Se realice en animales pertenecientes a especies cuya elección haya sido cuidadosamente valorada y cuyo grado de sensibilidad neurofisiológica sea el menor posible.
- c) Cause el menor dolor, sufrimiento, angustia o lesión a los animales.

6. Los procedimientos sólo podrán ser realizados por personas competentes o bajo la responsabilidad directa de ellas, o cuando se autoricen con arreglo a las disposiciones de la normativa nacional.

7. Cada procedimiento, a los efectos del cumplimiento de este real decreto, tendrá un único investigador responsable.

Artículo 17. *Procedimientos prohibidos.*

1. Quedan prohibidos los procedimientos en los que se utilicen los animales considerados en peligro de extinción de acuerdo con el apéndice I del CITES y el anexo A del Reglamento (CE) n.º 338/97 del Consejo, de 9 de diciembre de 1996, relativo a la protección de especies de la fauna y flora silvestres mediante el control de su comercio, así como aquellos que en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas de la Ley 4/1989, de 27 de marzo, de conservación de los espacios naturales y de la flora y fauna silvestres, se cataloguen como tales, a menos que se ajusten a la normativa citada y que los objetivos del procedimiento sean la investigación tendente a la protección de las especies de que se trate o fines biomédicos esenciales, cuando se compruebe que tales especies son excepcionalmente las únicas adecuadas para tales fines, y previa autorización de la autoridad competente.

2. No podrán llevarse a cabo procedimientos con animales capturados en la naturaleza o vagabundos, a menos que los realizados con otros animales no permitan alcanzar los objetivos perseguidos por el procedimiento, y previa autorización de la autoridad competente. En ningún caso podrán utilizarse perros o gatos vagabundos.

3. No podrán realizarse procedimientos con fines de formación y educación realizados en centros de enseñanza no superior, a menos que sea imprescindible según el programa de la formación de que se trate, y previa autorización de la autoridad competente.

Artículo 18. *Comunicación y autorización de procedimientos.*

1. Todos los establecimientos usuarios estarán obligados a comunicar a la autoridad competente los procedimientos que tienen previsto realizar.

2. Para poder llevar a cabo los procedimientos a los que hace referencia el anexo XI, se requerirá la autorización previa y expresa de la autoridad competente.

3. Para la comunicación del procedimiento debe presentarse a la autoridad competente la documentación enumerada en el anexo XII. La validez de la comunicación del procedimiento se corresponderá con la duración prevista en su memoria con un máximo de tres años, siempre y cuando no exista ninguna modificación relevante en él. La validez de esta comunicación se podrá prorrogar previa petición del centro usuario.

4. Para solicitar la autorización del procedimiento debe presentarse a la autoridad competente la documentación que se relaciona en el anexo XIII.

5. Cualquier modificación relevante de las memorias descriptivas recogidas en los anexos XII y XIII de procedimientos previamente comunicados y, en su caso, autorizados será comunicada a la autoridad competente. A estos efectos, se consideran modificaciones relevantes:

- a) El aumento en el número de animales que se vayan a utilizar, en el caso de especies protegidas.
- b) La utilización de una nueva especie protegida.
- c) El aumento significativo en el número de animales que se vayan a utilizar de especies no protegidas.
- d) El aumento del dolor o del sufrimiento del animal.
- e) Cambios del lugar en el que se prevé realizar el procedimiento.
- f) Que se dé cualquier circunstancia de las enumeradas en el anexo XI.

En el caso de modificaciones relevantes en la memoria de un procedimiento autorizado, será necesario solicitar una nueva autorización de la autoridad competente para poder efectuar el procedimiento.

6. La autoridad competente adjudicará un código de identificación a cada uno de los procedimientos.

7. Los centros de titularidad estatal comunicarán y, en su caso, solicitarán la preceptiva autorización a la Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

8. En el caso de las autorizaciones de procedimientos por la Administración General del Estado, será preceptivo el informe sobre dicho procedimiento de la Comisión ética nacional de bienestar animal a que se refiere el artículo 26.

Artículo 19. *Lugar de realización de los procedimientos.*

1. Los procedimientos se realizarán en centros registrados como centros usuarios.

2. Podrán llevarse a cabo procedimientos fuera de estos centros cuando sus características justifiquen esta circunstancia, y previa autorización de la autoridad competente.

3. Cuando se haga necesario para los fines legítimos del procedimiento, se podrá permitir que el animal afectado sea puesto en libertad, siempre que se hayan adoptado las medidas adecuadas para salvaguardar el bienestar del animal, en la medida en que su estado de salud lo permita, que no haya peligro para la sanidad animal, la salud pública o el medio ambiente, y previa autorización de la autoridad competente. En cualquier caso, cuando el procedimiento en el que se utilizan tenga exclusivamente fines docentes o de formación, no podrán liberarse los animales utilizados.

Artículo 20. Anestesia y analgesia durante el procedimiento.

1. Los procedimientos deberán llevarse a cabo con anestesia general o local, salvo que se considere que esta:

- a) Es más traumática para el animal que el procedimiento en sí.
- b) Es incompatible con los fines del procedimiento; en este caso, será preceptiva la autorización previa de la autoridad competente.

2. Si la anestesia no fuera posible, deberán utilizarse analgésicos u otros métodos idóneos para garantizar, en la medida de lo posible, que el dolor, el sufrimiento, la angustia o la lesión sean mínimos, y, en cualquier caso, que el animal no padezca dolor, angustia o sufrimiento intenso.

3. Siempre que sea compatible con los fines del procedimiento, cuando se prevea que un animal va a sufrir dolor intenso o prolongado después de haberse recuperado de la anestesia, se dispondrá de lo necesario para que sea tratado con la antelación suficiente, con medios adecuados para minimizar el dolor, o, cuando esto no sea posible, deberá ser sacrificado inmediatamente por métodos humanitarios.

4. En cualquier caso, y siempre que se prevea que el animal puede sufrir un dolor grave o prolongado, será necesaria la autorización previa del procedimiento por la autoridad competente.

5. En ningún caso podrá utilizarse un animal más de una vez en procedimientos que conlleven dolor intenso, angustia o sufrimiento equivalente.

Artículo 21. Fin del procedimiento.

1. Al término de todo procedimiento, se decidirá si el animal debe mantenerse con vida o debe ser sacrificado mediante un método humanitario. En todo caso, no se conservará con vida a un animal si, a pesar de haber recuperado la salud en todos los demás aspectos, es probable que padezca un dolor o sufrimiento duraderos. A este respecto, tales decisiones serán adoptadas por el veterinario responsable de la salud de los animales.

2. Cuando al término de un procedimiento:

a) Se vaya a conservar con vida a un animal, este deberá recibir el cuidado adecuado a su estado de salud, ser sometido a la vigilancia de un veterinario y mantenido en condiciones acordes con las exigencias del artículo 4. La vigilancia del veterinario podrá suspenderse cuando, en su opinión, el animal no vaya a sufrir como consecuencia de tal suspensión.

b) Sea necesario para los fines del procedimiento, sin perjuicio de las demás disposiciones de este real decreto, la autoridad competente podrá autorizar que un animal utilizado en un procedimiento sea devuelto a su medio habitual, y se adoptarán las medidas adecuadas para salvaguardar su bienestar, en la medida en que su estado de salud lo permita y no entrañe peligro ni para la sanidad animal, ni para la salud pública, ni para el medio ambiente.

c) Se decida no conservar con vida a un animal, o este no pueda beneficiarse de las condiciones establecidas en el artículo 4 relativas a su bienestar, este deberá ser sacrificado lo antes posible, mediante un método humanitario. La eliminación de los cadáveres y de los subproductos, si los hubiera, se realizará conforme a la legislación vigente.

3. En el caso de los animales de especies silvestres y, en particular, las especies amenazadas, se tendrán en cuenta los criterios relativos a la disposición de los animales establecidos en las resoluciones derivadas de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres respecto a la toma de decisiones sobre el mantenimiento en cautividad, reintroducción en el medio natural o la aplicación de la eutanasia a los animales al fin de los procedimientos.

CAPÍTULO V

Comités éticos de bienestar animal

Artículo 22. Creación de los comités éticos de bienestar animal.

1. En los centros usuarios de titularidad estatal existirá un comité ético de bienestar animal (en adelante, «el comité»), el cual debe velar por el cumplimiento de lo establecido en el artículo 11 y el capítulo IV.

2. El comité se dotará de un reglamento interno que defina y desarrolle, en su ámbito, sus integrantes y su funcionamiento básico según criterios de confidencialidad y representatividad, y que garantice la imparcialidad en sus decisiones.

Artículo 23. Composición.

1. El comité debe estar integrado por un mínimo de tres personas con la experiencia y los conocimientos necesarios para velar por el bienestar y el cuidado de los animales. Los miembros que, como mínimo, deben formar parte de estos comités serán los siguientes:

- a) El especialista en bienestar animal del centro.
- b) Un representante de la unidad de garantía de calidad del centro, cuando exista, o, en su defecto, un investigador del centro no directamente implicado en el procedimiento que deba informarse.
- c) Una persona con experiencia y conocimientos en bienestar de los animales que no tenga relación directa con el centro o con el procedimiento de que se trate.

2. En cualquier caso, deben estar constituidos por personas ajenas al procedimiento evaluado.

3. Los miembros respetarán el principio de confidencialidad.

4. Cuando se considere oportuno, solicitarán el asesoramiento de personas expertas que no pertenezcan al comité, las cuales también respetarán el principio de confidencialidad.

Artículo 24. Funciones.

Las funciones del comité son las siguientes:

a) Informar de la idoneidad de cada procedimiento en relación con los objetivos del estudio, la posibilidad de alcanzar conclusiones válidas con el menor número posible de animales, la consideración de métodos alternativos a la utilización de los animales y la idoneidad de las especies seleccionadas.

b) Informar de que cada procedimiento se lleva a cabo ajustándose a la memoria descriptiva notificada o aprobada a que se refieren los anexos XII y XIII.

c) Informar sobre la realización de los procedimientos, en especial de que:

1. Se ponen los medios para que los animales no sufran innecesariamente y para que se les proporcionen, cuando sea necesario, analgésicos, anestésicos u otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia.

2. Se utilizan métodos de eutanasia adecuados a la especie animal y al procedimiento que se realice.

3. El personal que participa en los procedimientos tenga la formación adecuada para llevar a cabo las tareas que se le encomiende.

Artículo 25. Exención de la creación de comités.

1. Los casos excepcionales en que se pueda eximir de la creación de estos comités se establecerán por la Dirección General de Ganadería.

2. En los centros eximidos de la creación del comité, las funciones establecidas en el artículo 24 deberán ser asumidas por un comité reconocido por la autoridad competente.

Artículo 26. Comisión ética estatal de bienestar animal.

1. Para los centros de titularidad estatal, se creará la Comisión ética estatal de bienestar animal (en adelante, «la Comisión») como órgano consultivo en materia de bienestar de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, adscrita al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

2. La Comisión tendrá las funciones de:

a) Informar con relación a las solicitudes de autorización de procedimientos.

b) Informar con relación a las solicitudes de exención de la obligación de crear comités.

c) Asesorar a los centros usuarios para el cumplimiento de esta normativa, especialmente sobre los métodos alternativos y técnicas que eviten procedimientos repetitivos o reiterativos.

d) Actuar como órgano de consulta.

3. La Comisión estará compuesta por los siguientes miembros:

a) Presidente: el Director General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

b) Vicepresidente primero: el Director General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia.

c) Vicepresidente segundo: el Director General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo.

d) Secretario: el Jefe de Servicio de Bienestar Animal de la Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

e) Vocales:

1.º Siete vocales en representación de la Administración General del Estado, pertenecientes a los siguientes ministerios:

Uno en representación del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, con rango de subdirector general.

Uno en representación del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, con rango de subdirector general.

Uno en representación del Ministerio de Sanidad y Consumo, con rango de subdirector general.

Dos en representación del Ministerio de Educación y Ciencia, con rango de subdirector general.

Dos en representación del Ministerio de Medio Ambiente, con rango de subdirector general.

Dichos vocales serán designados por el Subsecretario del departamento correspondiente, y, en los casos de

ausencia o enfermedad y, en general, cuando concurra alguna otra causa justificada, podrán ser sustituidos por otra persona al servicio de la unidad de la que dependan, que será designada del mismo modo.

2.º Un vocal representante de las organizaciones no gubernamentales de carácter nacional que tengan como uno de sus objetivos principales la defensa del bienestar animal, designado por el presidente de la Comisión y a propuesta de estas.

3.º Un vocal representante de las asociaciones profesionales especializadas en los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, designado por el presidente de la Comisión y a propuesta de estas.

4.º Un vocal representante del Consejo General de Colegios Veterinarios de España.

4. Podrán asistir con voz, pero sin voto, representantes de los sectores afectados y de las comunidades autónomas. Previa invitación, cuando se considere necesario, podrán asistir también expertos independientes.

5. Se podrán crear grupos de trabajo específicos con funciones concretas.

6. La Comisión aprobará sus normas de funcionamiento.

7. La Comisión se reunirá como mínimo cada tres meses.

8. Sin perjuicio de las peculiaridades previstas en este real decreto, la Comisión acomodará su funcionamiento al régimen previsto para los órganos colegiados en el capítulo II del título II de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común.

CAPÍTULO VI

Suministro de información y controles

Artículo 27. Suministro de información.

1. A los efectos de su comunicación a la Comisión Europea, los centros usuarios deben comunicar a la autoridad competente los procedimientos realizados, las especies y el número de animales utilizados en cada uno de ellos, en los plazos y la forma que para cada centro establezca la autoridad competente. Por las comunidades autónomas, se remitirá dicha información a la Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación antes del 31 de marzo de cada año con los datos referentes al año anterior, a fin de que por este se traslade la misma a la Comisión Europea a través del cauce correspondiente.

2. Para los centros de titularidad estatal, la comunicación a que se refiere en el apartado 1 se efectuará antes del 31 de marzo de cada año con los datos referentes al año anterior.

3. Basándose en las solicitudes de autorización y en las notificaciones recibidas, y de acuerdo con los informes elaborados, la autoridad competente recogerá y, en la medida de lo posible, publicará periódicamente la información estadística sobre la utilización de animales en procedimientos con respecto al:

a) Número y las especies de animales utilizados en los procedimientos.

b) Número de animales, por categorías seleccionadas, utilizadas en los procedimientos mencionados en el artículo 2.

c) Número de animales, por categorías seleccionadas, utilizados en los procedimientos exigidos por la legislación.

4. Las autoridades competentes adoptarán todas las medidas necesarias para garantizar la protección del carácter confidencial de las informaciones que presenten un interés comercial particular que se comuniquen conforme a este real decreto.

Artículo 28. *Controles.*

1. El control del cumplimiento de las normas contenidas en este real decreto se efectuará por la autoridad competente; a tal fin, efectuará las inspecciones periódicas precisas y remitirá a la Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, antes del 31 de marzo de cada año, un informe sobre el resultado de las inspecciones realizadas el año precedente.

2. Estas inspecciones, que podrán realizarse con ocasión de controles efectuados con otros fines, se efectuarán anualmente sobre muestras estadísticamente representativas de los centros existentes en el territorio de cada comunidad autónoma.

3. Cada ministerio, en el ámbito de sus competencias, elaborará con las comunidades autónomas un plan anual de controles de acuerdo con un análisis de riesgos, que podrá incluir la determinación del tamaño de la muestra que deberá ser objeto de inspección en cada comunidad autónoma, así como los criterios básicos para la elección de la muestra y, en su caso, el listado de los centros que se vayan a inspeccionar.

4. En el diseño del plan de inspección, se prestará especial atención a los centros eximidos de la obligación de disponer de un comité propio.

Disposición adicional única. *Recursos humanos y materiales.*

La creación y el funcionamiento del Registro de los centros de cría, suministradores y usuarios y de la Comisión ética estatal de bienestar animal serán atendidos con los medios humanos y materiales existentes en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, sin que ello suponga incremento del gasto público.

Disposición transitoria primera. *Centros registrados de acuerdo con el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo.*

Los centros registrados al amparo de lo dispuesto en el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, que se encuentren en funcionamiento, deberán comunicar la información complementaria necesaria según lo dispuesto en este real decreto a la autoridad competente, en un plazo no superior a los seis meses, la cual adaptará las inscripciones en los registros a lo dispuesto en este real decreto.

Disposición transitoria segunda. *Procedimientos en tramitación.*

Lo dispuesto en el artículo 18 sobre expedientes de notificación y/o autorización de los procedimientos que estén en tramitación o se tramiten en el plazo de seis meses a partir de la entrada en vigor de este real decreto podrán tramitarse de acuerdo con el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo.

Disposición transitoria tercera. *Homologación de la formación.*

No obstante lo dispuesto en el artículo 9.1, la autoridad competente podrá decidir, a solicitud del interesado, que deberá presentarse dentro de los seis meses siguientes a la publicación de este real decreto en el «Boletín Oficial del Estado», no exigir la posesión del

título académico correspondiente al personal que acreditara suficientemente venir realizando las tareas y funciones previstas en el artículo 9.1 y en el anexo I durante los siguientes periodos de tiempo, en función de cada categoría:

a) Personal de la categoría A: dos años antes de la entrada en vigor de este real decreto.

b) Personal de la categoría B: cinco años antes de la entrada en vigor de este real decreto.

c) Personal de la categoría C: 10 años antes de la entrada en vigor de este real decreto.

d) Personal de la categoría D: 10 años antes de la entrada en vigor de este real decreto.

Una vez concedida dicha excepción, esta surtirá efectos permanentes en todo el territorio nacional y facultará al interesado para realizar las funciones correspondientes a la categoría de que se trate en toda España.

Disposición derogatoria única. *Derogación normativa.*

Quedan derogadas cuantas normas de igual o inferior rango se opongan a lo dispuesto en este real decreto y, específicamente, el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y la Orden de 13 de octubre de 1989, por la que se establecen las normas de registro de los establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación de titularidad estatal, así como las de autorización para empleo de animales en experimentos, en desarrollo del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo.

Disposición final primera. *Carácter básico y título competencial.*

Este real decreto tiene carácter básico y se dicta al amparo de las competencias exclusivas reconocidas al Estado por la Constitución en su artículo 149.1.13.^a en materia de bases y coordinación de la planificación general de la actividad económica, y en el artículo 149.1.16.^a en materia de bases y coordinación general de la sanidad.

Disposición final segunda. *Facultad de desarrollo y modificación.*

1. Se faculta a los Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Educación y Ciencia para dictar, en el ámbito de sus competencias, las disposiciones necesarias para el desarrollo y cumplimiento de este real decreto y, en particular, para modificar sus anexos para su adaptación a la normativa comunitaria o por motivos urgentes de protección de los animales.

2. Específicamente, se faculta al Ministro de Educación y Ciencia para establecer la formación del personal competente para trabajar en los centros.

Disposición final tercera. *Entrada en vigor.*

El presente real decreto entrará en vigor un mes después de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado», excepto el capítulo V, que lo hará seis meses después de su publicación.

Dado en Madrid, el 10 de octubre de 2005.

JUAN CARLOS R.

La Vicepresidenta Primera del Gobierno
y Ministra de la Presidencia,
MARÍA TERESA FERNÁNDEZ DE LA VEGA SANZ

ANEXO I

Personal competente para trabajar en los centros

Se definen cuatro categorías profesionales, que se clasifican de la siguiente forma:

A. Personal de la categoría A: personal para el cuidado de los animales. Los programas de enseñanza para esta categoría incluirán como mínimo:

1. Conceptos básicos relativos a los aspectos éticos y normativos de los cuidados proporcionados a los animales de experimentación.
2. Manipulación y mantenimiento de los animales:
 - a) Medio ambiente, equipos, jaulas y accesorios en las instalaciones para los animales: descripción, utilización y mantenimiento.
 - b) Manipulación y contención de los animales.
 - c) Conocimientos básicos sobre los métodos de eutanasia humanitaria de las especies afectadas.
 - d) Elementos generales de fisiología y de comportamiento de las especies animales utilizadas con fines experimentales.
 - e) Mantenimiento de los animales y, en caso necesario, cría de éstos.
 - f) Verificación de las condiciones medioambientales en los animalarios.

3. Reconocimiento del estado de salud y de las enfermedades:

- a) Higiene y control de las enfermedades.
 - b) Elementos de fisiología general y de comportamiento de las especies animales utilizadas con fines experimentales.
4. Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia.
5. Normativa referente a la seguridad, la administración, el transporte, la recepción, el aprovisionamiento de animales y la eliminación de los cadáveres.
6. Formación específica, en caso necesario, para todo trabajo de asistencia durante los procedimientos.

B. Personal de la categoría B: personal que lleva a cabo los procedimientos. Los programas de enseñanza para esta categoría incluirán como mínimo:

1. Conocimientos básicos apropiados sobre el mantenimiento de los animales y acerca de la normativa sobre la seguridad, la administración, el transporte, la recepción y el aprovisionamiento de animales y la eliminación de los cadáveres.
2. Conceptos básicos relativos a los aspectos éticos y normativos de los cuidados proporcionados a los animales de experimentación.
3. Manipulación y principios básicos del mantenimiento de los animales:
 - a) Características biológicas, en particular, fisiológicas y del comportamiento, de las especies, razas y líneas de los animales, de acuerdo con las tareas que se vayan a cumplir.
 - b) Manipulación y contención de los animales.
 - c) Métodos de eutanasia humanitaria de las especies afectadas.
4. Reconocimiento del estado de salud y de las enfermedades: aspectos prácticos del seguimiento del estado de salud y de las enfermedades.
5. Implicaciones del estatus microbiológico de los animales.
6. Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia.
7. Formación apropiada para la realización de los procedimientos. En la medida en que sea necesario para las tareas que se vayan a realizar:

a) Apreciación de los elementos que se deben tener en cuenta desde la concepción de un procedimiento, incluyendo el refinamiento, la reducción y el reemplazo.

b) Importancia del sistema de alojamiento y del ambiente inmediato de los animales para los procedimientos.

c) Anatomía de los animales utilizados para fines experimentales.

d) Anestesia, analgesia y apreciación de la necesidad de poner fin al procedimiento para reducir lo más posible los sufrimientos del animal.

e) Técnicas apropiadas e intervenciones quirúrgicas.

El programa de formación del personal de categoría B debe tener un importante componente práctico, aspecto este último que se llevará a cabo bajo la supervisión de una persona con amplia experiencia en los aspectos estudiados.

C. Personal de la categoría C: personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos. Se considerará que los científicos responsables del diseño y de la dirección de procedimientos son competentes cuando:

1. Sean titulados superiores con nivel equivalente a una licenciatura en una disciplina como la Biología (animal), la Medicina, la Veterinaria u otra disciplina con formación adecuada en zoología, anatomía y fisiología.
2. Hayan participado en un curso básico sobre la ciencia de los animales de laboratorio, con el fin de desarrollar un nivel de responsabilidad apropiado para un uso de los animales de acuerdo con las normas científicas de alto nivel, cuyo programa incluya como mínimo:

- a) Aspectos éticos y legislación.
- b) Biología y mantenimiento de los animales de experimentación.
- c) Microbiología y enfermedades.
- d) Diseño de procedimientos con animales.
- e) Anestesia, analgesia y procedimientos experimentales.
- f) Alternativas al uso de animales.
- g) Análisis de la literatura científica apropiada.

D. Personal de la categoría D: personal especialista en ciencias del animal de experimentación con funciones de asesoramiento sobre el bienestar de los animales.

1. Personal especialista en bienestar animal: persona con titulación universitaria superior en el área de Ciencias de la Salud, encargada de supervisar y asesorar todos los aspectos relacionados con el bienestar de los animales.

2. Personal especialista en salud animal: persona licenciada en Veterinaria con formación complementaria especializada en animales de experimentación, encargada de supervisar y asesorar todos los aspectos relacionados con la salud de los animales.

ANEXO II

Líneas directrices relativas al alojamiento de los animales

1. Instalaciones.

1.1 Funciones y proyecto general.

1.1.1 Las instalaciones se construirán de forma que suministren un ambiente adecuado para las especies alojadas en ellas y se diseñarán para evitar el acceso de personas no autorizadas.

1.1.2 Las instalaciones que formen parte de un edificio mayor se protegerán mediante normas de construcción y disposiciones que limiten el número de accesos e impidan la circulación de personas no autorizadas.

1.1.3 Se recomienda la existencia de un programa de mantenimiento de las instalaciones para evitar cualquier fallo de su equipamiento.

1.2 Locales de alojamiento.

1.2.1 Se tomarán todas las medidas necesarias para garantizar la limpieza regular y eficaz de los locales, así como el mantenimiento de un nivel higiénico satisfactorio. Los techos y paredes serán resistentes, con superficies lisas, impermeables y fácilmente lavables. Se prestará especial atención a las juntas con puertas, conductos, tubos y cables. Las puertas y ventanas, en su caso, estarán construidas o protegidas de forma que eviten el acceso de animales ajenos al establecimiento. Los suelos serán lisos, impermeables, no deslizantes y fácilmente lavables y soportarán el peso de las estanterías u otros materiales pesados. En el caso de que haya sumideros, estarán cubiertos adecuadamente y dispondrán de una barrera que evite el acceso de animales ajenos al centro.

1.2.2 Las zonas donde los animales se mueven libremente tendrán paredes y suelos con un revestimiento especialmente resistente para soportar el gran desgaste causado por éstos y las operaciones de limpieza. Dicho material no será perjudicial para la salud de los animales ni que pueda causar heridas a los animales. En esas zonas son aconsejables los sumideros. Los equipos y accesorios deberán protegerse especialmente para evitar que los animales los estropeen o se hieran con ellos.

1.2.3 Los locales destinados al alojamiento de animales de experimentación de granja (vacuno, ovino, caprino, porcino, equino, aves de corral, etc.) cumplirán la normativa vigente referente a los animales de granja.

1.2.4 No se alojarán juntas especies incompatibles.

1.2.5 Los locales de alojamiento podrán disponer de instalaciones para realizar procedimientos o manipulaciones menores, en su caso.

1.3 Laboratorios y locales de experimentación con fines generales y especiales.

1.3.1 Los establecimientos de cría o suministradores dispondrán de instalaciones adecuadas para preparar la expedición de animales.

1.3.2 Todos los establecimientos dispondrán, al menos, de instalaciones para realizar pruebas sencillas de diagnóstico, necropsias y/o recogida de muestras para investigaciones más amplias.

1.3.3 Deberán tomarse medidas a la recepción de los animales para el establecimiento de cuarentenas.

1.3.4 Se dispondrá de locales de experimentación con fines generales y especiales, siempre que no sea conveniente realizar los procedimientos u observaciones en el local de alojamiento.

1.3.5 Se dispondrá de locales para alojar por separado a los animales enfermos o heridos.

1.3.6 Se dispondrá, en su caso, de una o más salas convenientemente equipadas para la realización de experimentos quirúrgicos en condiciones asépticas. También es conveniente disponer de instalaciones para el período posoperatorio cuando sea necesario.

1.4 Locales de servicio.

1.4.1 Los locales para el almacenamiento de los alimentos y/o camas deberán ser frescos, secos y a prueba de parásitos e insectos. Otros materiales que pudieran estar contaminados o presentar peligro se almacenarán en un local diferente.

1.4.2 Se dispondrá de locales para almacenamiento de jaulas, instrumentos y cualquier otro material limpio.

1.4.3 Los locales de limpieza y lavado serán lo bastante amplios para alojar las instalaciones necesarias para descontaminar y limpiar el material usado. El proceso de limpieza debería organizarse de forma que quede separado el circuito de material limpio del de material sucio, para evitar la contaminación del material recién limpiado. Las paredes y los suelos deberían estar recubiertos con un material resistente adecuado y el sistema

de ventilación debería tener suficiente capacidad para eliminar el exceso de calor y de humedad.

1.4.4 Se adoptarán disposiciones para el almacenamiento y la eliminación de los cadáveres y residuos de los animales en condiciones higiénicas satisfactorias. Se tomarán medidas para la eliminación de dichos restos con garantías de seguridad y atendiendo a la normativa vigente. Se adoptarán precauciones especiales con los residuos muy tóxicos o radiactivos.

1.4.5 El proyecto y construcción de las zonas de circulación se adecuará a las normas establecidas para los locales de alojamiento. Se aconseja que los pasillos sean bastante anchos para permitir la fácil circulación del material móvil.

2. Condiciones ambientales en los locales de alojamiento y su control.

2.1 Ventilación.

2.1.1 Los locales de alojamiento tendrán un sistema adecuado de ventilación que satisfaga las exigencias de las especies alojadas. El objeto del sistema de ventilación es suministrar aire limpio y mantener bajo el nivel de olores, gases nocivos, polvo y agentes infecciosos de cualquier tipo. También eliminará el exceso de calor y de humedad.

2.1.2 El aire en el local se renovará con intervalos frecuentes. En condiciones normales el régimen de ventilación debería ser de 15 a 20 renovaciones de aire por hora.

2.1.3 El sistema de ventilación se proyectará de forma que se eviten las corrientes de aire.

2.2 Temperatura.

2.2.1 La tabla 1 muestra los márgenes de temperatura recomendados. Las cifras se refieren sólo a animales adultos normales. Se ajustará la temperatura de los locales de acuerdo con los cambios eventuales en la regulación térmica de los animales, que puedan deberse a condiciones fisiológicas especiales o a los efectos del procedimiento.

2.2.2 Se dispondrá de un sistema de climatización que sea capaz tanto de calentar como de enfriar el aire que suministra.

2.2.3 En los establecimientos usuarios es necesario el control preciso de la temperatura de los locales de alojamiento, ya que la temperatura del ambiente es un factor físico que afecta profundamente al metabolismo de todos los animales.

2.3 Humedad.

La humedad relativa óptima en los locales de alojamiento será de 55% $\pm$ 10%. Deberían evitarse los índices inferiores al 40% y superiores al 70% de humedad relativa durante periodos prolongados.

2.4 Iluminación.

En los locales que carezcan de ventanas, es necesario disponer de un sistema de iluminación controlada tanto para satisfacer las necesidades biológicas de los animales como para proporcionar un ambiente de trabajo satisfactorio. También es necesario controlar la intensidad y el ciclo de luz-oscuridad.

2.5 Ruidos.

Los ruidos pueden constituir una importante causa de molestias para los animales. Los locales de alojamiento y de experimentación deberán aislarse de focos de ruidos fuertes de frecuencias audibles y más altas, con el fin de evitar trastornos en la conducta y en la fisiología de los animales.

2.6 Sistemas de alarma.

2.6.1 Cuando la salud y el bienestar de los animales dependan de un sistema artificial, deberán preverse sistemas de emergencia apropiados que garanticen el mantenimiento de las condiciones ambientales adecuadas, y

deberá contarse con sistemas de alarma que adviertan en caso de avería.

2.6.2 Tanto los sistemas de alarma como de emergencia deberán revisarse con regularidad, y se mantendrá un registro de dichas revisiones.

2.6.3 Se dispondrá de instrucciones claras, expuestas en lugar bien visible, sobre los procedimientos de emergencia y alarma.

2.6.4 Se velará por que el funcionamiento de los sistemas perturben lo menos posible a los animales.

3. Enjaulado.

3.1 En las tablas 2 a 12 se encuentran las líneas directrices que se sugieren para jaulas, cercados, corrales y establos.

3.2 En las figuras 1 a 7 se encuentran indicaciones suplementarias sobre la superficie mínima de las jaulas.

3.3 En las figuras 8 a 12, se presentan las indicaciones correspondientes para la estimación del nivel de ocupación de las jaulas.

3.4 Las jaulas y cercados deben ser de materiales no perjudiciales para la salud de los animales.

3.5 Se proyectarán de forma que los animales no puedan lesionarse y, a menos que sean desechables, de material resistente a la limpieza y la descontaminación.

3.6 Los suelos de jaulas y cercados serán apropiados a la especie y edad de los animales y se proyectarán de forma que facilite la eliminación de los excrementos.

3.7 Se diseñarán los cercados teniendo presente el bienestar de los animales. Conviene que permitan la satisfacción de determinadas necesidades etológicas (por ejemplo, la necesidad de trepar, esconderse o resguardarse temporalmente) y que faciliten su limpieza, evitando, asimismo, el contacto con otros animales cuando se estime necesario.

TABLA 1

Líneas directrices para la temperatura ambiente (animales alojados en jaulas o cercados)

Especie o grupos de especies	Zona óptima en °C
Primates del Nuevo Mundo no humanos	20-28
Ratón	20-24
Rata	20-24
Hámster sirio	20-24
Jerbo	20-24
Cobaya	20-24
Primates del Viejo Mundo no humanos . .	20-24
Codorniz	20-24
Conejo	15-21
Gato	15-21
Perro	15-21
Hurón	15-21
Aves de corral	15-21
Paloma	15-21
Porcina	10-24
Caprina	10-24
Ovina	10-24
Bovina	10-24
Caballar	10-24

Nota: en casos especiales, por ejemplo, cuando se trata de animales muy jóvenes o sin pelo, pueden ser necesarias temperaturas ambiente superiores a las indicadas.

TABLA 2

Líneas directrices para el enjaulado de pequeños roedores y conejos (en reserva y durante los procedimientos)

Especie	Superficie mínima del suelo de la jaula en cm²	Altura mínima de la jaula en cm
Ratón	180	12
Rata	350	14
Hámster sirio	180	12
Cobaya	600	18
Conejo 1 kg	1.400	30
Conejo 2 kg	2.000	30
Conejo 3 kg	2.500	35
Conejo 4 kg	3.000	40
Conejo 5 kg	3.600	40

Nota: por «altura de la jaula» se entenderá la distancia vertical entre el suelo de la jaula y la parte horizontal superior de la tapa o de la jaula.

Al planificar procedimientos, conviene tener en cuenta el crecimiento potencial de los animales, para disponer siempre de suficiente espacio con arreglo a esta tabla en todas las fases de la experimentación.

Ver también las figuras 1 a 5 y 8 a 12.

TABLA 3

Líneas directrices para el enjaulado de pequeños roedores durante la cría

Especie	Superficie mínima del suelo de la jaula por madre y su prole en cm²	Altura mínima de la jaula en cm
Ratón	200	12
Rata	800	14
Hámster	6.500	12
Cobaya	1.200	18
Cobaya en colectividades . .	1.000 por adulto	18

Nota: ver la nota de la tabla 2 para la definición de «altura de jaula».

TABLA 4

Líneas directrices para el enjaulado de conejos durante la cría

Peso de la coneja en kg	Superficie mínima del suelo de la jaula por coneja y su prole en m²	Altura mínima de la jaula en cm	Superficie mínima del suelo del nido en m²
1	0,30	30	0,1
2	0,35	30	0,1
3	0,40	35	0,12
4	0,45	40	0,12
5	0,50	40	0,14

Nota: para la definición de «altura de la jaula», ver la nota de la tabla 2.

La superficie mínima del suelo de la jaula por coneja y su prole ya incluye la superficie del suelo del nido.

Ver también la figura 6.

TABLA 5

Líneas directrices para el alojamiento de gatos (durante los procedimientos y la cría)

Peso del gato en kg	Superficie mínima del suelo de la jaula por gato en m ²	Altura mínima de la jaula en cm	Superficie mínima del suelo de la jaula por gata y su prole en m ²	Superficie mínima del suelo de cercado por gata y su prole en m ²
0,5 - 1	0,2	50	—	—
1 - 3	0,3	50	0,58	2
3 - 4	0,4	50	0,58	2
4 - 5	0,6	50	0,58	2

Nota: se debería limitar al mínimo el alojamiento de gatos en jaulas. Los gatos reclusos de esta forma deberían salir a hacer ejercicio al menos una vez por día, siempre que esto no dificulte el procedimiento. Es aconsejable que los cercados para gatos estén dotados de bandejas para las deposiciones, de amplio espacio en repisas para descansar y de objetos que permitan trepar y afilar las garras.

Por «altura de la jaula» se entenderá la distancia entre el punto más alto del suelo y el punto más bajo del techo de la jaula.

La zona de las repisas puede incluirse al calcular la superficie mínima del suelo. La superficie mínima del suelo de la jaula por gata y su prole incluye la superficie de 0,18 m² de la caja para los partos.

Ver también la figura 7.

TABLA 6

Líneas directrices para el alojamiento de perros en jaulas (durante la realización de los procedimientos)

Altura del perro a nivel de la cruz en cm	Superficie mínima del suelo de la jaula por perro en m ²	Altura mínima de la jaula en cm
30	0,75	60
70	1,00	60
75	1,75	140

Nota: los perros sólo deberían permanecer en las jaulas el tiempo estrictamente necesario para los propósitos del procedimiento. Se aconseja soltar a los perros enjaulados para que hagan ejercicio una vez al día, siempre que esto no sea incompatible con el objetivo del procedimiento. Se recomienda limitar la reclusión de los perros sin facilitarles ejercicio diario. Interesa que las zonas para el ejercicio sean bastante grandes para que el perro tenga libertad de movimientos. No se aconseja usar suelos de rejilla en las jaulas de perros, a menos que así lo requiera el procedimiento.

Teniendo en cuenta las grandes diferencias en la altura y la poca relación entre altura y peso en diversas razas de perros, la altura de la jaula debería basarse en la altura del cuerpo a nivel de la cruz del animal. Como regla general, se aconseja que la altura mínima de la jaula sea doble respecto a la altura de la cruz.

Para la definición de «altura de la jaula», ver la nota de la tabla 5.

TABLA 7

Líneas directrices para el alojamiento de perros en cercados (en reserva y durante experimentación y cría)

Peso del perro en kg	Superficie mínima del suelo del cercado por perro en m ²	Superficie mínima adyacente para ejercicio por perro	
		Hasta tres perros por m ²	Más de tres perros por m ²
< 6	0,5	0,5 (1,0)	0,5 (1,0)
6-10	0,7	1,4 (2,1)	1,2 (1,9)
10-20	1,2	1,6 (2,8)	1,4 (2,6)
20-30	1,7	1,9 (3,6)	1,6 (3,3)
> 30	2,0	2,0 (4,0)	1,8 (3,8)

Nota: las cifras entre paréntesis indican la superficie total por perro, es decir, la superficie del suelo del cercado más la superficie adyacente para ejercicio. Los perros alojados permanentemente al aire libre deberían tener acceso a un lugar cubierto para protegerse de la intemperie. Cuando los perros estén alojados sobre suelo de rejilla, se aconseja que dispongan de una superficie lisa para dormir. No se recomienda utilizar suelos de rejilla a menos que el procedimiento así lo requiera. Las divisiones entre cercados impedirán a los perros herirse mutuamente.

Los cercados tendrán un sistema adecuado de desagüe.

TABLA 8

Líneas directrices para el alojamiento de primates no humanos (en reserva y durante procedimientos y cría)

Nota preliminar: debido a la gran diversidad de tamaños y características de los primates, es especialmente importante adaptar la forma y los accesorios internos, así como las dimensiones de sus jaulas a sus necesidades particulares. El volumen total de la jaula es tan importante para los primates como la superficie del suelo. Como principio general, la altura debería ser la mayor dimensión de la jaula, al menos para los antropomorfos y otros simios. Las jaulas tendrán altura suficiente al menos para que los animales puedan ponerse de pie. Es recomendable que la altura mínima de la jaula para los animales que se desplacen suspendidos sea suficiente para que puedan balancearse extendidos totalmente sin que lleguen a tocar el suelo de la jaula con los pies. En su caso, se dispondrán las perchas de modo que los primates puedan utilizar la parte superior de la jaula.

Pueden alojarse en una misma jaula dos primates compatibles. Cuando no se puedan poner en parejas, es conveniente colocar las jaulas de forma que puedan verse mutuamente, pero también que exista la posibilidad de evitarlo cuando sea necesario.

Teniendo en cuenta estas observaciones, la tabla siguiente constituye una orientación general para el enjaulado de los grupos de especies más utilizadas (superfamilias «Ceboidea» y «Cercopitheoidea»).

Peso del primate en kg	Superficie mínima del suelo de la jaula para uno o dos animales en m ²	Altura mínima de la jaula en cm
< 1	0,25	60
1 - 3	0,35	75
3 - 5	0,50	80
5 - 7	0,70	85
7 - 9	0,90	90
9 - 15	1,10	125
15 - 25	1,50	125

Nota: para la definición de «altura de la jaula» ver la nota de la tabla 5.

TABLA 9

Líneas directrices para el enjaulado de cerdos (en reserva y durante experimentación)

Peso del cerdo en kg	Superficie mínima del suelo de la jaula por cerdo en m²	Altura mínima de la jaula en cm
5 – 15	0,35	50
15 – 25	0,55	60
25 – 40	0,80	80

Nota: esta tabla se aplicaría también a los lechones. No se recomienda mantener a los cerdos enjaulados a menos que sea indispensable para el objetivo del procedimiento y en tal caso sólo durante el mínimo tiempo. Para la definición de «altura de la jaula», ver la nota de la tabla 5.

TABLA 10

Líneas directrices para el alojamiento de animales de granja en cercados (en reserva y durante la experimentación en los establecimientos usuarios)

Especies y pesos en kg	Superficie mínima del suelo del cercado en m²	Longitud mínima del cercado en m	Altura mínima de las divisiones del cercado en m	Superficie mínima del suelo del cercado para grupos en m² por animal	Longitud mínima de comedero por cabeza en m
Porcina 10 – 30	2	1,6	0,8	0,2	0,20
30 – 50	2	1,8	1,0	0,3	0,25
50 – 100	3	2,1	1,2	0,8	0,30
100 – 150	5	2,5	1,4	1,2	0,35
> 150	5	2,5	1,4	2,5	0,40
Ovina < 70	1,4	1,8	1,2	0,7	0,35
Caprina < 70	1,6	1,8	2,0	0,8	0,35

Especies y pesos en kg	Superficie mínima del suelo del cercado en m²	Longitud mínima del cercado en m	Altura mínima de las divisiones del cercado en m	Superficie mínima del suelo del cercado para grupos en m² por animal	Longitud mínima de comedero por cabeza en m
Bovina < 60	2,0	1,1	1,0	0,8	0,30
60 – 100	2,2	1,8	1,0	1,0	0,30
100 – 150	2,4	1,8	1,0	1,2	0,35
150 – 200	2,5	2,0	1,2	1,4	0,40
200 – 400	2,6	2,2	1,4	1,6	0,55
> 400	2,8	2,2	1,4	1,8	0,65
Caballar (adultos)	13,5	4,5	1,8	–	–

TABLA 11

Líneas directrices para el alojamiento de animales de granja en compartimentos (en reserva y durante la experimentación en los establecimientos usuarios)

Especies y pesos en kg	Superficie mínima del compartimento en m²	Longitud mínima del compartimento en m	Altura mínima de las divisiones de los compartimentos en m
Porcina 100–150	1,2	2,0	0,9
> 150	2,5	2,5	1,4
Ovina < 70	0,7	1,0	0,9
Caprina < 70	0,8	1,0	0,9
Bovina 60 – 100	0,6	1,0	0,9
100 – 150	0,9	1,4	0,9
150 – 200	1,2	1,6	1,4
200 – 350	1,8	1,8	1,4
350 – 500	2,1	1,9	1,4
> 500	2,6	2,2	1,4
Caballar (adultos)	4,0	2,5	1,6

Nota: conviene que los compartimentos sean lo bastante anchos para que el animal pueda tumbarse cómodamente.

TABLA 12

Líneas directrices para el enjaulado de aves (en reserva y durante la experimentación en establecimientos usuarios)

Especies y pesos en g		Superficie mínima por ave en cm²	Superficie mínima para dos aves en cm² por ave	Superficie mínima para tres o más aves en cm² por ave	Altura mínima de la jaula en cm	Longitud mínima de comedero por ave en cm
Pollos	100-300	250	200	150	25	3
	300-600	500	400	300	35	7
	600-1.200	1.000	600	450	45	10
	1.200-1.800	1.200	700	550	45	12
	1.800-2.400	1.400	850	650	45	12
(Machos adultos) . . .	> 2.400	1.800	1.200	1.000	60	15
Codornices	120-140	350	250	200	15	4

Nota: por «superficie» se entenderá el producto de la longitud por la anchura de la jaula medidas horizontalmente por dentro, y no el producto de la longitud por la anchura del suelo.

Para la definición de «altura de la jaula», ver la nota de la tabla 5.

Las aberturas de las mallas en los suelos de rejilla no superarán los 10 x 10 mm para los pollitos, y los 25 x 25 mm para pollos mayores y adultos. El grosor del alambre debería ser, al menos, de 2 mm. La inclinación del suelo no debería pasar del 14% (8°). Es aconsejable que los bebederos tengan la misma longitud que los comederos. Si se utilizan bebederos con tetina o copas, es conveniente que cada ave tenga acceso a dos. Es oportuno que las jaulas estén equipadas con perchas y permitan a las aves alojadas en jaulas individuales verse unas a otras.

FIGURA 1

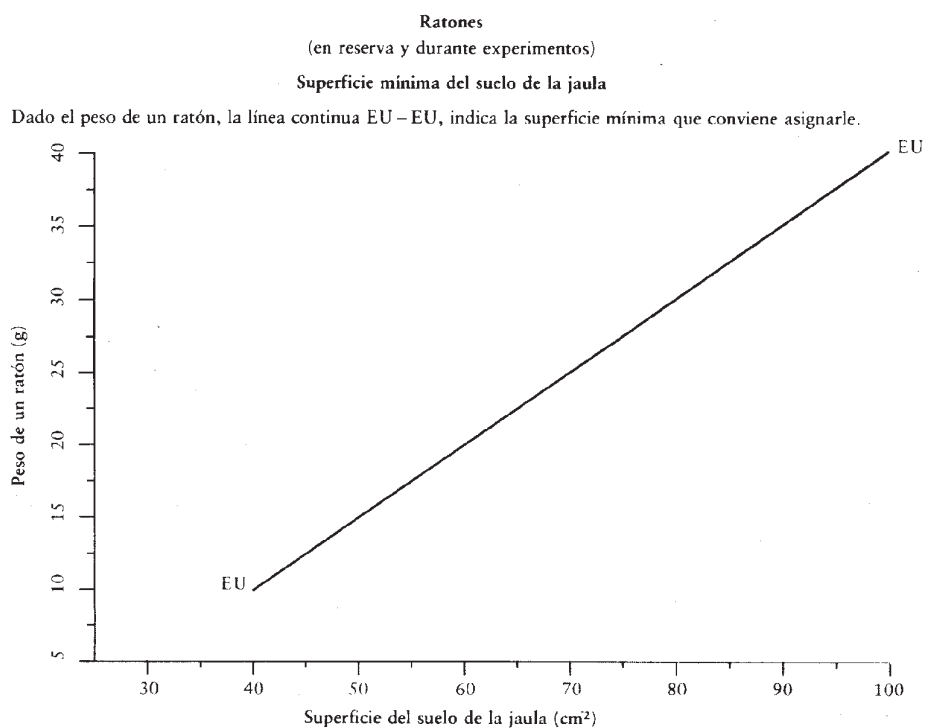


FIGURA 2

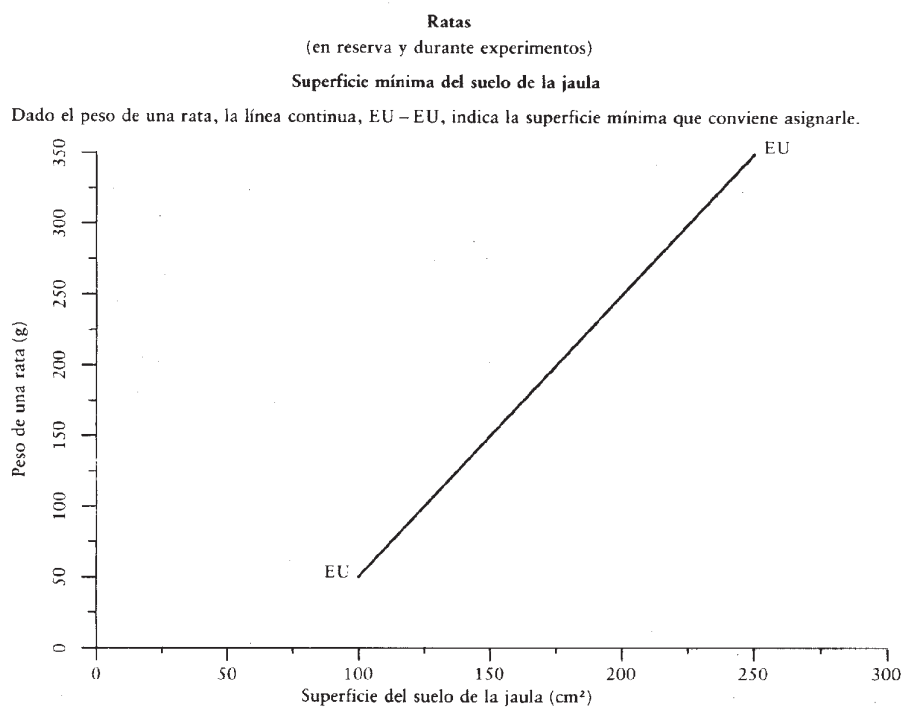


FIGURA 3

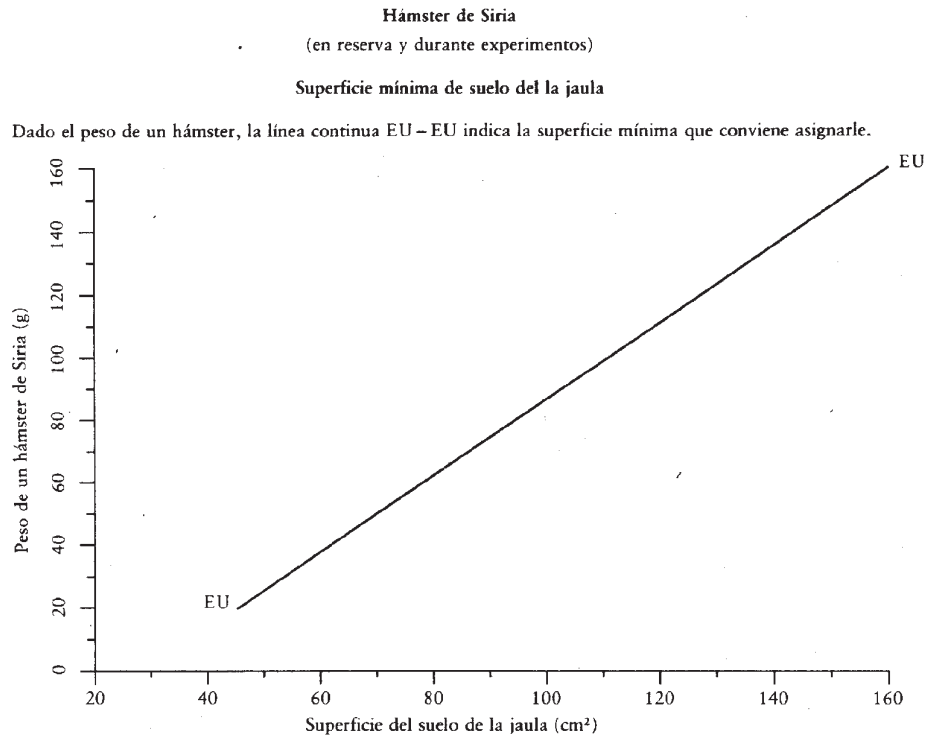


FIGURA 4

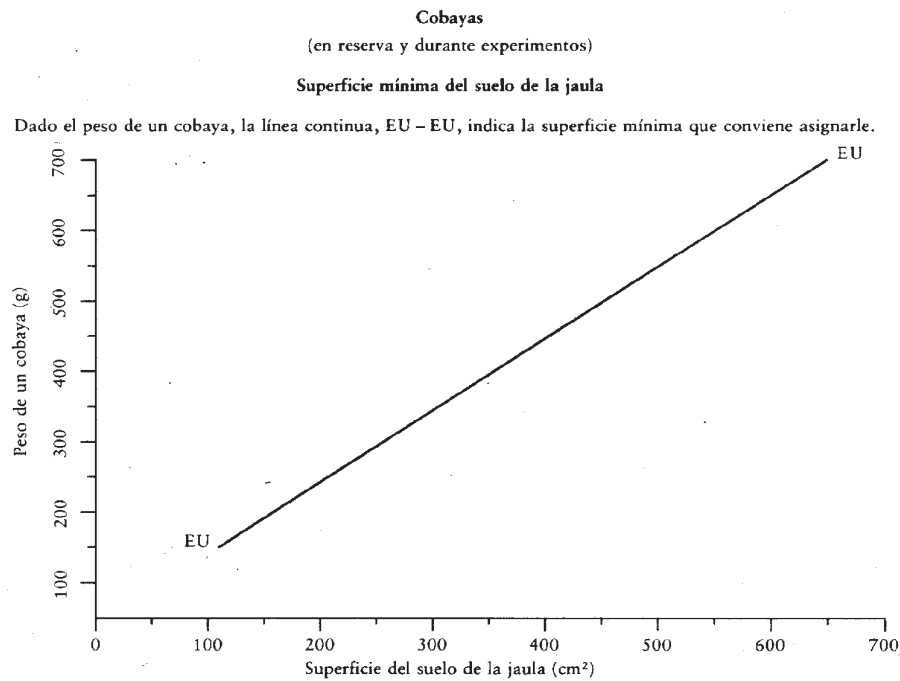


FIGURA 5

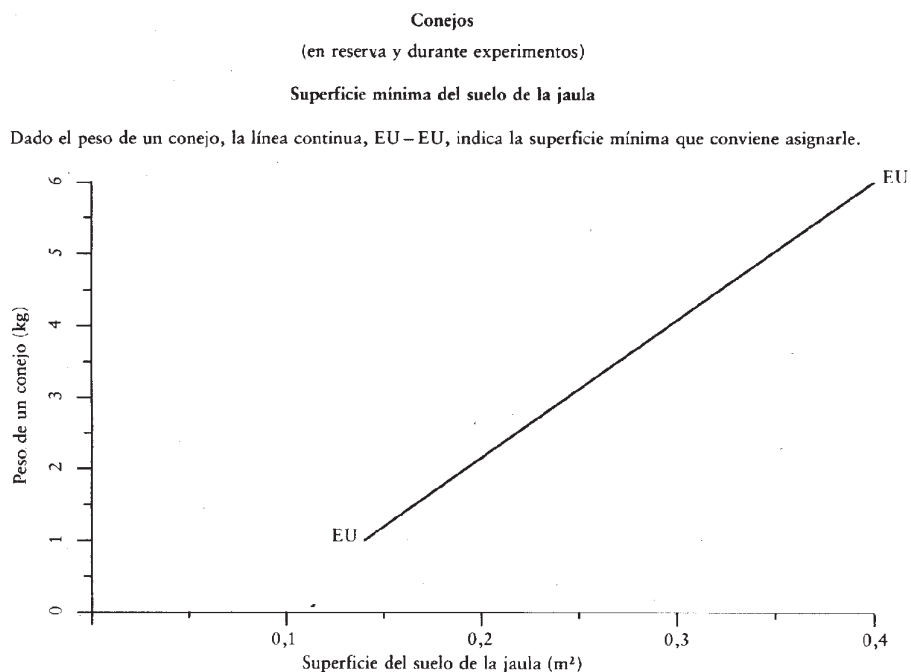


FIGURA 6

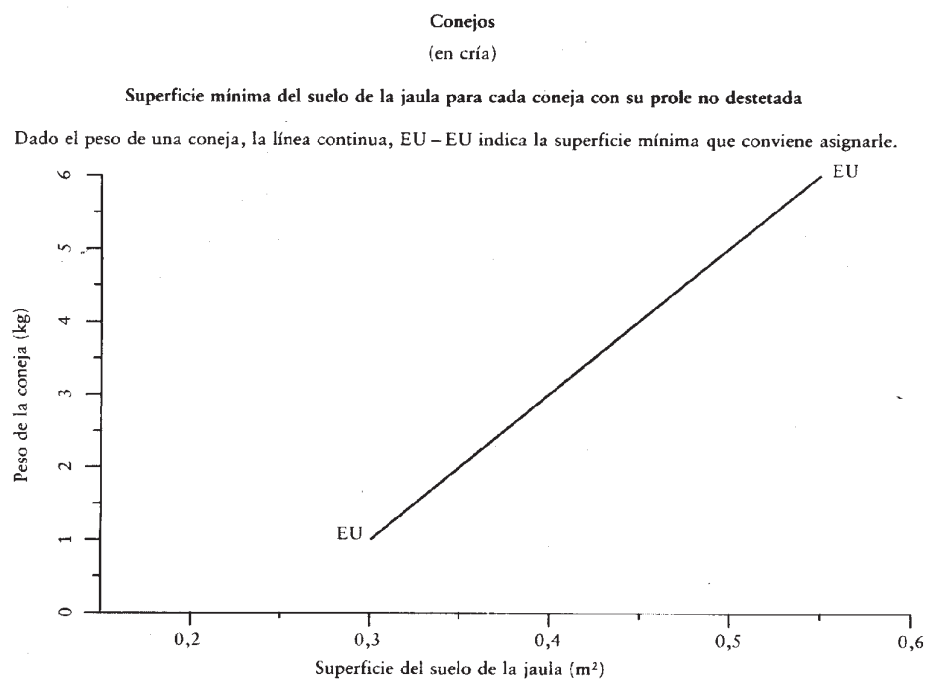


FIGURA 7

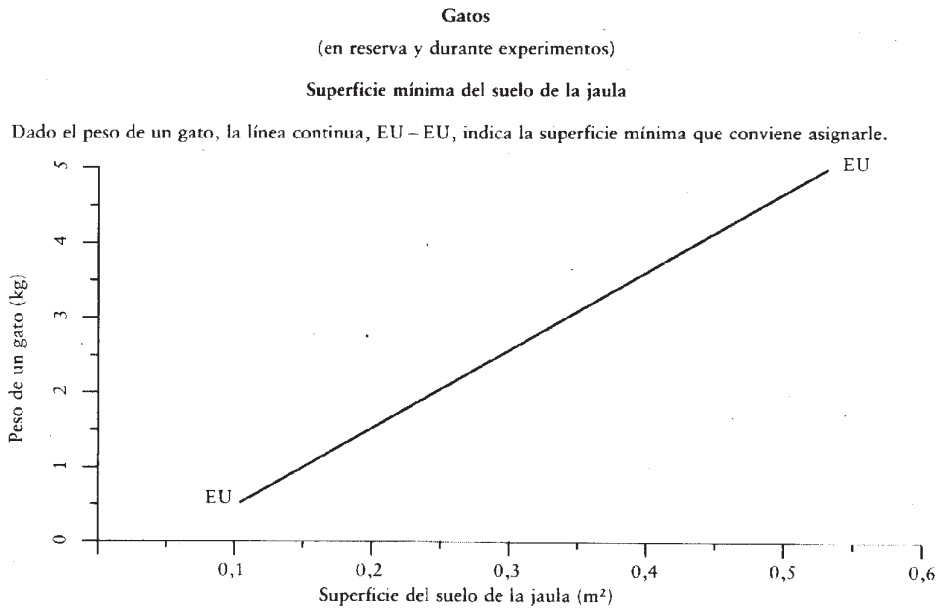


FIGURA 8

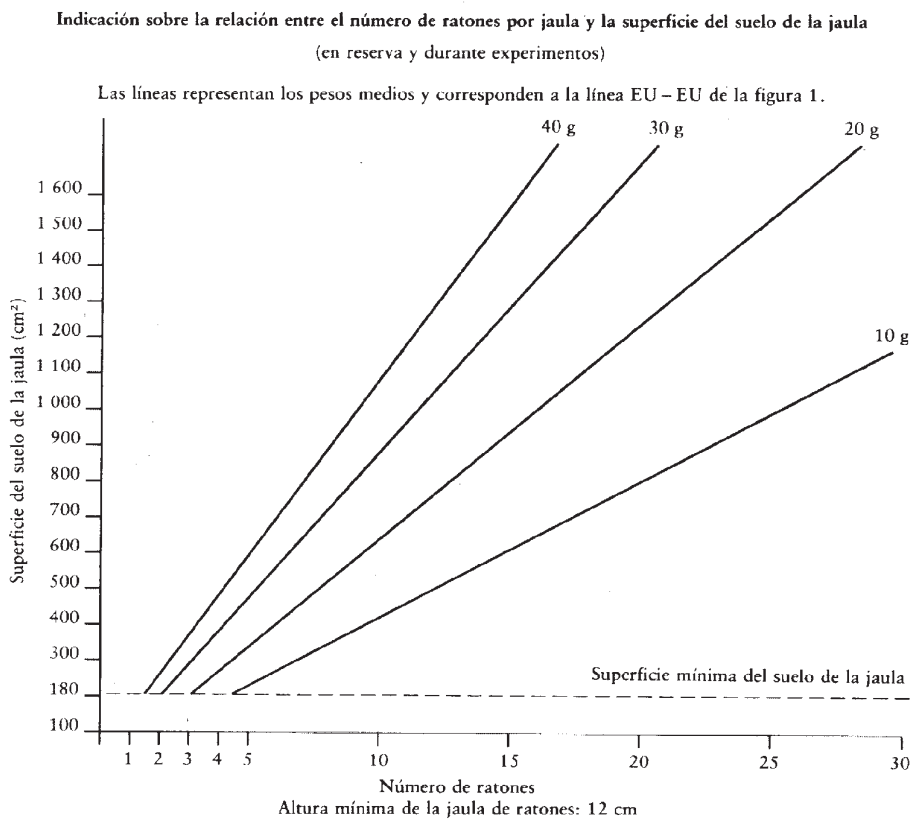


FIGURA 9

Indicación sobre la relación entre el número de ratas por jaula y la superficie del suelo de la jaula
(en reserva y durante experimentos)

Las líneas representan los pesos medios y corresponden a la línea EU – EU de la figura 2.

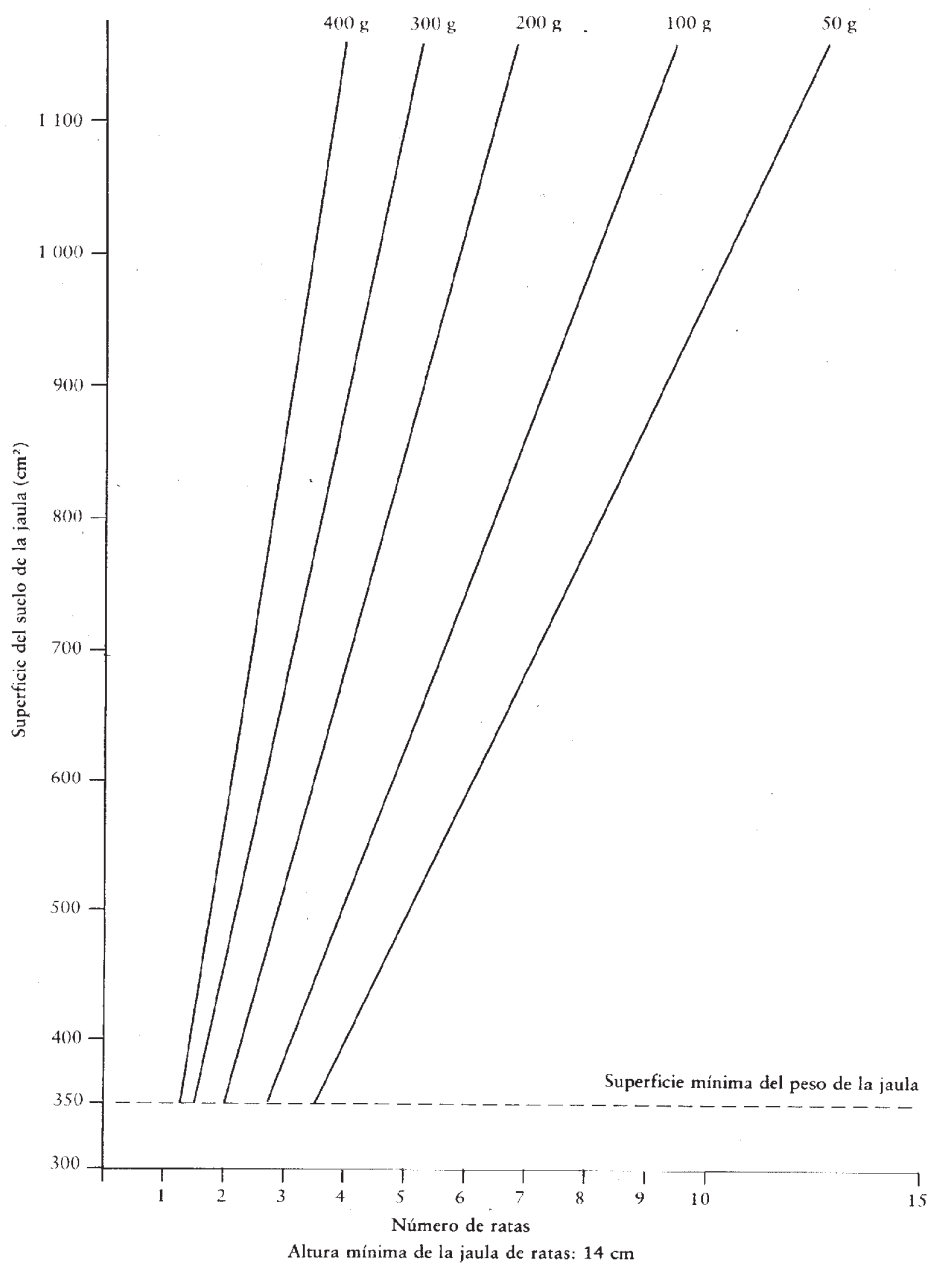


FIGURA 10

Indicación sobre la relación entre el número de hámsters por jaula y la superficie del suelo de la jaula
(en reserva y durante experimentos)

Las líneas representan los pesos medios y corresponden a la línea EU –EU de la figura 3.

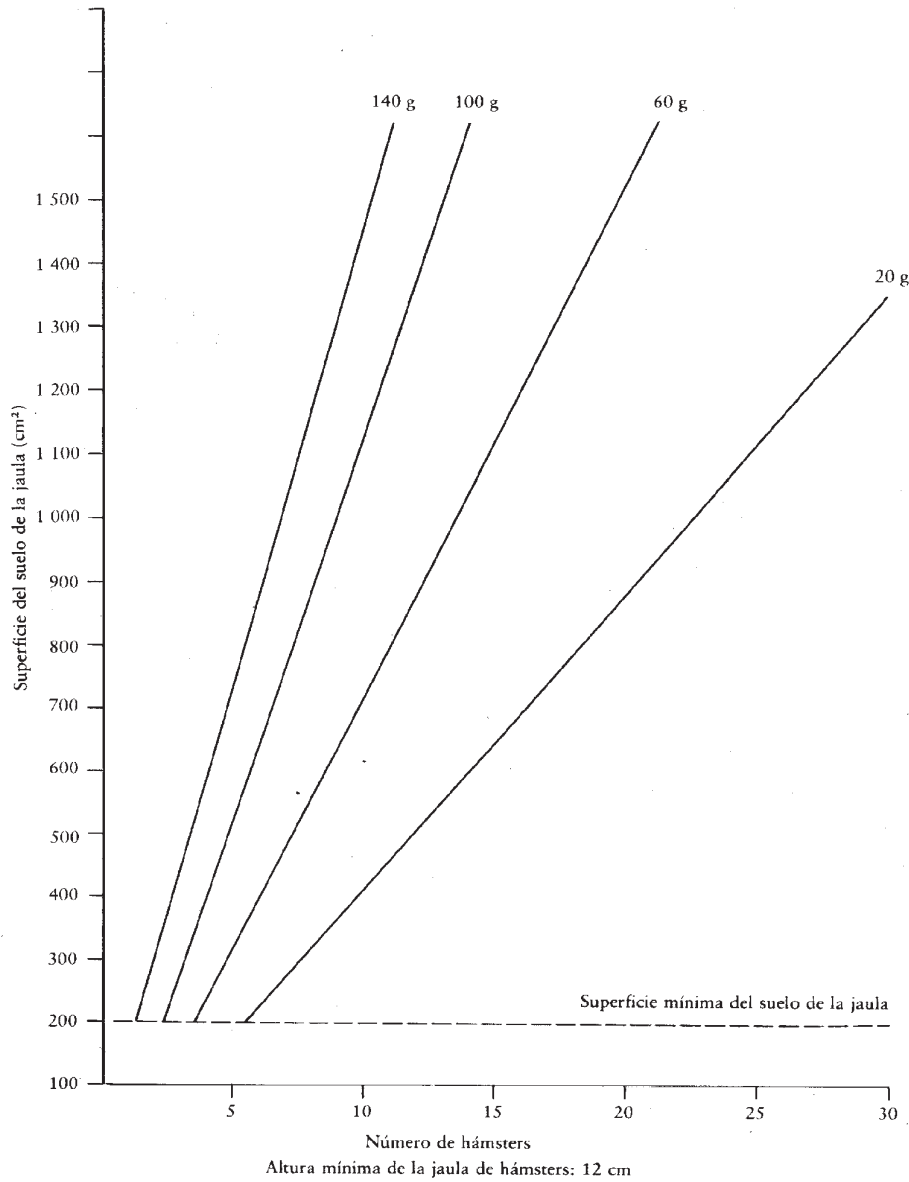


FIGURA 11

Indicación sobre la relación entre el número de cobayas por jaula y la superficie del suelo de la jaula
(en reserva y durante experimentos)

Las líneas representan los pesos medios y corresponden a la línea EU - EU de la figura 4.

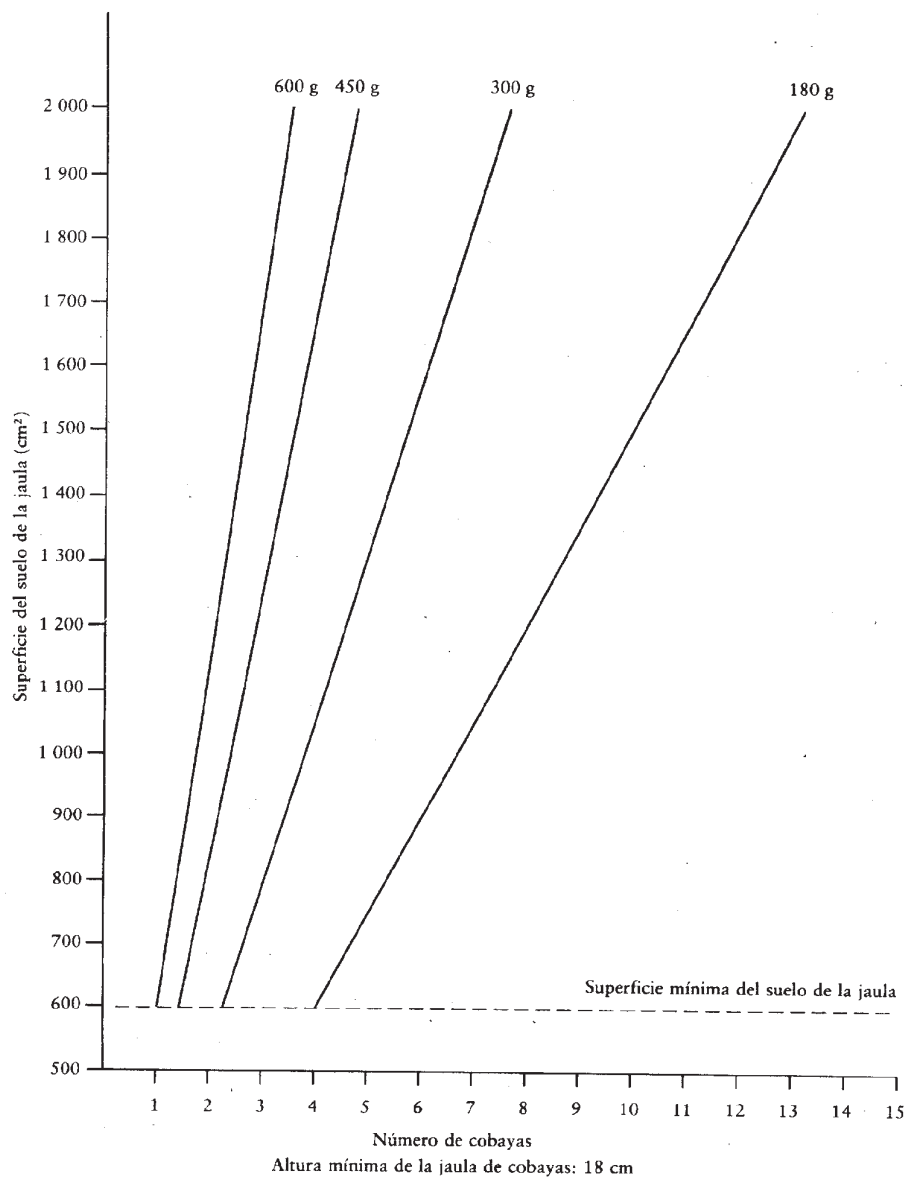
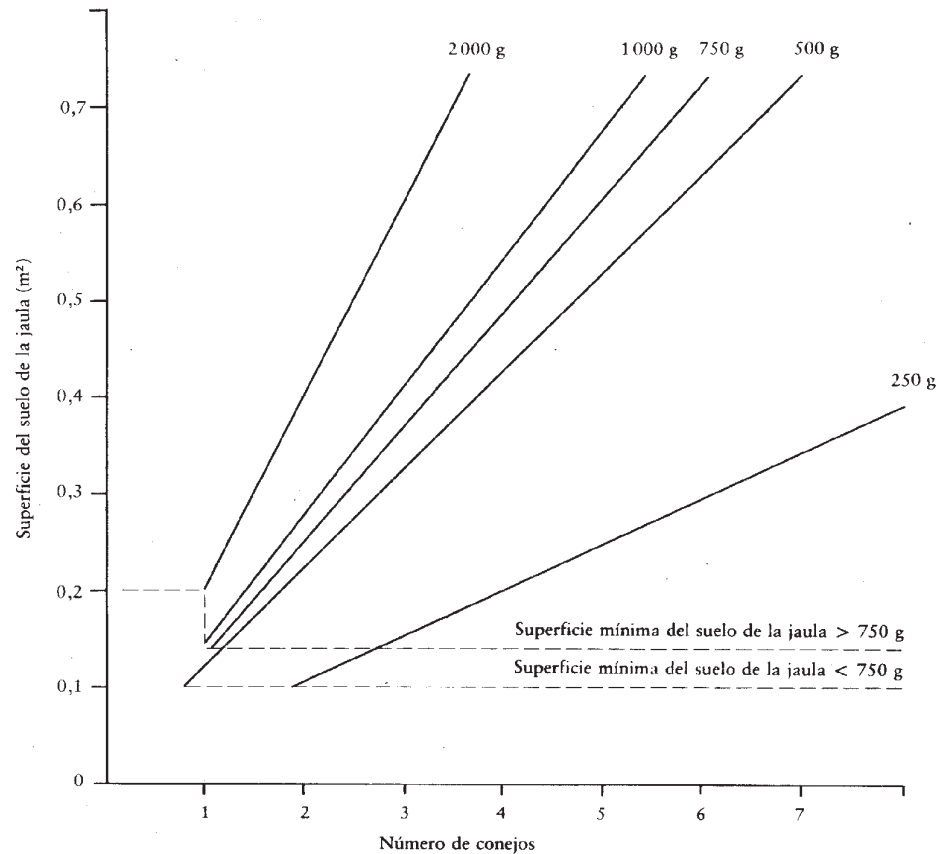


FIGURA 12

Indicación sobre la relación entre el número de conejos por jaula y la superficie del suelo de la jaula
(en cría y durante su experimentación)

Las líneas representan los pesos medios y corresponden a la línea EU – EU de la figura 5.



Altura mínima de la jaula de conejos: ver la Tabla 3.

ANEXO III

Líneas directrices relativas al cuidado de los animales

1. Captura: Los animales salvajes se capturarán solamente mediante métodos humanitarios y con la intervención de expertos que posean un profundo conocimiento de las costumbres y el hábitat de los animales que interesa atrapar. Si hubiera que utilizar algún anestésico u otro fármaco en la operación de captura, lo administrará un veterinario. Cualquier animal que fuera herido gravemente debe ser sometido lo antes posible a los cuidados de un veterinario. Si, en opinión del veterinario, el animal sólo puede seguir viviendo con sufrimiento o lesiones, conviene sacrificarlo inmediatamente por un método humanitario. En ausencia de veterinario, a todo animal que sufra heridas graves es conveniente sacrificarlo inmediatamente por un método humanitario.

2. Recepción y desembalaje.

2.1 Se recibirán y desembalarán los envíos de animales evitando cualquier retraso.

2.2 Después de inspeccionarlos, se alojará a los animales en jaulas o cercados limpios y se les dará alimentos y agua en función de sus necesidades.

2.3 Se mantendrá a los animales que estén enfermos o se encuentren mal por cualquier otra causa en observación y aparte de los otros.

2.4 Un veterinario los examinará lo antes posible y, en caso necesario, los tratará.

2.5 Los animales que no tengan ninguna posibilidad de recuperación serán sacrificados inmediatamente mediante un método humanitario.

2.6 Todos los animales recibidos se identificarán y registrarán de acuerdo con la normativa vigente.

2.7 Las cajas utilizadas para el transporte, si no se pueden descontaminar de forma adecuada, se destruirán inmediatamente.

3. Cuarentena, aislamiento y aclimatación.

3.1 Se dispondrá de instalaciones separadas para aislar a los animales que, por presentar síntomas o ser sospechosos de mala salud, puedan representar un peligro para el hombre o los otros animales.

3.2 Incluso cuando los animales presenten buena salud, es conveniente someterlos a un período de aclimatación antes de utilizarlos en un procedimiento (véase tabla 1). El tiempo necesario depende de diversos factores, como el estrés al que se haya sometido al animal, que a su vez depende de diversos factores, tales como la duración del transporte y la edad del animal. Una persona competente decidirá la duración de dicho período.

4. Alimentación.

4.1 La elaboración de alimentos se atendrá a la normativa vigente. Los comederos, bebederos y demás utensilios utilizados para la alimentación se limpiarán de forma regular y, en su caso, se esterilizarán. Si se utilizan alimentos húmedos o que se contaminen fácilmente con agua, orina, etc., será necesaria su limpieza diaria.

4.2 Aunque el proceso de distribución de comida puede variar según la especie, debe realizarse de forma que satisfaga las necesidades fisiológicas del animal. Todos los animales podrán acceder al alimento.

5. Agua.

5.1 Todos los animales dispondrán siempre de agua potable no contaminada.

5.2 Los biberones serán de material transparente para permitir el control de su contenido. Conviene que sean de boca ancha para facilitar su limpieza y, si se utiliza material plástico, no liberarán sustancias solubles. Tapas, tapones y tubos serán esterilizables y de fácil limpieza. Los biberones y accesorios serán desmontables y se limpiarán y esterilizarán a intervalos regulares.

5.3 Los sistemas automáticos de bebida se controlarán, revisarán y limpiarán regularmente para evitar accidentes y la propagación de infecciones. Si se utilizan jaulas de suelo liso, conviene tomar medidas a fin de reducir el riesgo de inundaciones. También es necesario el control bacteriológico periódico del sistema para garantizar la calidad del agua.

5.4 El agua procedente de la red pública contiene microorganismos que generalmente se consideran inocuos, a menos que se trabaje con animales de definición microbiológica. En estos casos habría que tratar el agua. El agua de suministro público suele estar clorada para reducir el crecimiento de microorganismos. Dicha cloración no siempre basta para impedir el crecimiento de algunos gérmenes patógenos potenciales, como, por ejemplo, las «*Pseudomonas spp.*». Como medida complementaria, cabe elevar el nivel de cloro del agua o acidificarla para conseguir el efecto deseado.

5.5 En los peces, anfibios y reptiles la tolerancia a la acidez, al cloro y a muchas otras sustancias químicas varía ampliamente según las especies. Por lo tanto, es necesario tomar las medidas necesarias para adaptar el suministro de agua de los acuarios y viveros a las necesidades y límites de tolerancia de cada especie.

6. Cama: La cama será absorbente, sin polvo, no tóxica y libre de agentes infecciosos, parásitos o cualquier otra forma de contaminación. Se pondrá especial cuidado en evitar la utilización de serrín u otro material de cama derivado de madera tratada químicamente.

7. Ejercicio y manipulación.

7.1 Se aprovechará cualquier oportunidad para que los animales hagan ejercicio.

7.2 El comportamiento de un animal durante un procedimiento depende en gran medida de su confianza en las personas que hay que desarrollar. Se recomienda mantener contactos frecuentes para que los animales se acostumbren a la presencia y actividad humana.

8. Limpieza.

8.1 La calidad de una instalación depende en gran medida de una buena higiene. Se darán instrucciones claras para cambiar la cama de las jaulas y cercados.

8.2 Se establecerá un programa adecuado para la limpieza, el lavado, la descontaminación y, cuando sea necesario, la esterilización de las jaulas, accesorios, biberones y cualquier otro material. También conviene mantener un alto grado de limpieza y orden en los locales de alojamiento, lavado y almacenamiento.

8.3 El material que recubre el suelo de las jaulas, cercados y corrales se renovará periódicamente para evitar que se conviertan en un foco de infección o de infestación por parásitos.

9. Sacrificio con métodos humanitarios de los animales.

9.1 Todo método humano de sacrificio de los animales exige conocimientos que solo pueden adquirirse mediante una formación adecuada.

9.2 No debe permitirse la eliminación de los cadáveres antes de que sobrevenga el rigor mortis.

Tabla 1

Especie	Días
Ratón	5-15
Rata	5-15
Jerbo	5-15
Cobaya	5-15
Hámster sirio	5-15
Conejo	20-30
Gato	20-30
Perro	20-30
Primates no humanos	40-60

ANEXO IV

Datos mínimos para consignar en el documento de traslado emitido por el especialista en salud animal

- Remitente: nombre de su titular, número de registro y dirección.
- Destinatario: nombre del centro, número de registro y dirección.
- Lugar de carga, o lugar de captura en el caso de animales salvajes.
- Tipo de medio de transporte e identificación de este.
- Transportista, con especificación de su número de autorización para el transporte de animales vivos.
- Especie transportada.
- Número de animales.
- Identificación individual, si procede.
- Estado sanitario de los animales objeto de traslado, de acuerdo con la normativa que afecte a la especie trasladada.
- Nombre, apellidos, número del documento nacional de identidad y firma del especialista en salud animal que extiende el documento.
- Fecha.
- Si se trata de animales salvajes, se indicará el permiso de captura de la autoridad competente.
- Se indicará si son animales de excepción según el artículo 3.1.b)2.º del Real Decreto 1041/1997, de 27 de junio, por el que se establecen las normas relativas a la protección de los animales durante su transporte.
- Justificación de los supuestos del artículo 5.4, si los hubiera.
- Causa de la excepción, descripción de la situación, instrucciones de manejo y cuidados durante el transporte.
- Día y hora de la carga.
- Duración estimada del transporte.
- Día y hora prevista de la descarga.

ANEXO V

Datos mínimos para la identificación en las jaulas o sistemas de confinamientos

- Especie.
- Raza (en su caso).
- Cepa (en su caso).
- Sexo.
- Fecha de nacimiento.
- Fecha de cruce (si son parejas).
- Número de animales.
- En los centros usuarios, en su caso, investigador responsable del procedimiento en el que están siendo utilizados los animales, departamento al que este está adscrito y código de identificación del procedimiento.
- Observaciones.

ANEXO VI

Datos mínimos del libro de registro de los animales en los centros

Todos los centros deben llevar un registro de los animales en el cual deben anotarse los siguientes datos:

- El nombre y el número de registro del centro.
- El número de animales presentes en el centro en el momento de abrir este registro, indicando la especie o especies a que pertenecen.
- Las entradas de los animales, la fecha en que se producen, indicando la especie, los nacimientos y las compras, haciendo constar su origen (con mención del nombre y dirección del centro criador o suministrador).
- Las salidas de los animales, la fecha en que se producen y la especie, haciendo constar su destinatario (con mención del nombre y dirección del destinatario).

e) Los animales sacrificados o muertos no utilizados en procedimientos, y sus causas, y, en su caso, el método de sacrificio utilizado.

f) Los animales utilizados en procedimientos, indicando a qué procedimiento están destinados.

g) Las observaciones efectuadas durante el período de cuarentena de los animales que provienen del exterior del centro.

h) Los resultados de los exámenes sanitarios efectuados a los animales.

i) Los resultados de las necropsias realizadas.

j) Los casos de enfermedad y los tratamientos administrados.

k) En el caso de los animales criados, suministrados o utilizados en procedimientos, de especies en que reglamentariamente esté establecido, se hará constar la identificación individual de cada animal.

l) Se harán constar los datos referentes al origen y la identificación individual de perros, gatos y primates no humanos.

m) En los centros que críen animales de especies ganaderas para las cuales sea obligatorio la existencia y mantenimiento de un libro de registro, será de aplicación la normativa vigente en este ámbito.

ANEXO VII

Lista de especies animales a los que se aplican las disposiciones del artículo 15

Ratón: «Mus musculus».
Rata: «Rattus norvegicus».
Cobaya: «Cavia porcellus».
Hámster dorado: «Mesocricetus auratus».
Conejo: «Oryctolagus cuniculus».
Primates no humanos.
Perro: «Canis familiaris».
Gato: «Felis catus».
Codorniz: «Coturnix coturnix».

ANEXO VIII

Datos mínimos de los centros inscritos en la base de datos nacional de centros de animales de experimentación

- Número de registro.
- Nombre del establecimiento.
- Dirección completa.
- N.º de teléfono, n.º de fax, dirección de correo electrónico.
- Tipo de establecimiento.
- Especies animales presentes en el establecimiento.
- Responsable del centro (persona física o jurídica).

ANEXO IX

Documentación mínima requerida para la inscripción de los centros en el registro

1. Solicitud que contenga los siguientes datos:

- Nombre del centro.
- Dirección completa.
- Titular del centro, nombre y, si procede, razón social y número de código de identificación fiscal o número de identificación fiscal.
- Tipo de establecimiento (cría, suministrador o usuario).

2. Informe que contenga, como mínimo:

- Memoria descriptiva y planos o croquis de situación, distribución de las construcciones, instalaciones y dependencias, así como la capacidad en

número de animales y actividades que en él se prevé que van a desarrollar.

b) Programa higiénico-sanitario que prevea todas las medidas de control establecidas por la normativa vigente.

c) Memoria descriptiva de los aspectos fundamentales de los procedimientos que se prevé realizar, especies y número de animales que se críen, suministren o utilicen.

d) Informes técnico y sanitario. El informe sanitario estará suscrito por el especialista en salud animal.

e) Identificación del responsable administrativo del centro.

f) Identificación del responsable del bienestar de los animales.

g) Identificación del veterinario responsable de la salud de los animales.

h) Relación del personal especializado, con especificación de su formación, titulación y experiencia. En el caso de centros usuarios universitarios y centros públicos de investigación, únicamente se inscribirá la relación del personal para el cuidado de los animales, el personal especialista en bienestar animal y el especialista en salud animal.

i) Cuando se trate de un centro usuario de titularidad estatal, se inscribirá, además, la composición del comité.

ANEXO X

Características del registro

Unidad responsable de la declaración y registro del fichero: Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Finalidad: registro de los establecimientos suministradores de cría y usuarios de animales de experimentación, en cumplimiento de lo establecido en la Directiva 86/609/CEE del Consejo, de 24 de noviembre de 1986.

Usos: control, por medio de la autoridad competente, del cumplimiento de la normativa vigente.

Personas y colectivos afectados: todo centro suministrador, de cría o usuario de animales de experimentación que radique en España.

Procedimientos de recogida de datos: serán aportados por el propio interesado ante los órganos competentes de las autoridades competentes.

Estructura básica del fichero y descripción de los tipos de datos de carácter personal incluidos en él: datos de carácter identificativo de la persona responsable, de la persona o personas especialistas en bienestar animal o en salud animal del centro: nombre, documento nacional de identidad, formación.

Cesiones de datos de carácter personal y transferencias internacionales de datos: a las comunidades autónomas en el ámbito de sus competencias.

Órgano responsable: Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Comunidades Autónomas.

Órgano ante el que pueden ejercitarse los derechos de acceso, rectificación y cancelación: autoridades competentes citadas en el artículo 3.o).

Medidas de seguridad con indicación del nivel exigible: nivel básico.

ANEXO XI

Procedimientos que necesitan autorización previa y expresa de la autoridad competente

a) La utilización de animales de las especies incluidas en el anexo VII que no hayan nacido ni hayan sido expresamente criados en centros oficialmente reconocidos.

b) La utilización de animales de las especies no incluidas en el anexo VII que no procedan de centros de cría o suministro.

c) La ejecución de procedimientos fuera de los centros usuarios.

d) La liberación de los animales durante el procedimiento.

e) La utilización de animales salvajes capturados en la naturaleza, de animales vagabundos, de animales procedentes de centros de protección animal oficiales o de animales protegidos o en peligro de extinción, si lo permite la normativa específica de protección, siempre que los objetivos del procedimiento sean la investigación que tienda a la protección de estas especies o a otros fines biomédicos esenciales y se compruebe que las citadas especies son excepcionalmente las únicas adecuadas para la finalidad que se pretende. Se excluyen las actividades científicas relacionadas con el anillado, el marcaje, y la toma de muestras para análisis rutinarios.

f) La ejecución de procedimientos con fines docentes en centros de enseñanza no superior.

g) La realización de procedimientos en los que no se utiliza anestesia, analgesia u otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia, por ser incompatibles con los resultados perseguidos por el procedimiento o por estar contraindicada.

h) La ejecución de procedimientos en que el animal puede sufrir un dolor grave o prolongado.

i) En aquellos procedimientos en los que se han utilizado animales capturados en la naturaleza, la liberación al medio originario de estos animales, una vez terminados aquellos.

ANEXO XII

Documentación mínima para la comunicación de procedimientos

1. Una memoria descriptiva del procedimiento, en la que se hará constar:

a) La denominación del procedimiento a realizar.

b) Los objetivos que se persiguen.

c) La metodología del procedimiento. En el caso de que las directrices de un procedimiento estén publicadas con carácter oficial o hayan sido oficialmente validadas, se considerará cumplimentado este extremo, siempre que se aporte una copia de la publicación o validación correspondiente.

d) Justificación de la necesidad de usar animales para la obtención de los resultados perseguidos con el procedimiento.

e) La especie y el número de animales que se prevé utilizar.

f) La duración del procedimiento y frecuencia de realización previstos.

g) Fecha prevista de inicio y fecha prevista de finalización del procedimiento.

h) Destino final de los animales y, en el caso de sacrificio, el método utilizado.

i) La identificación del personal investigador responsable del procedimiento.

j) Los datos del centro responsable de la estabulación de los animales durante el procedimiento, haciendo constar su número de registro correspondiente. Cualquier cambio de ubicación de los animales a otro centro registrado quedará reflejado en el libro de registro de estos.

2. En los centros de titularidad estatal, informe del comité ético de bienestar animal de los animales usados en los procedimientos. Una copia del informe tendrá que ser remitida al centro usuario correspondiente.

ANEXO XIII**Documentación para la solicitud de autorización previa y expresa de procedimientos**

1. Memoria descriptiva del procedimiento, en la que se hará constar:

a) La denominación del procedimiento que se prevé realizar.

b) Los objetivos que se persiguen.

c) La metodología del procedimiento. En el caso de que las directrices de un procedimiento estén publicadas con carácter oficial o hayan sido oficialmente validadas, se considerará cumplimentado este extremo, siempre que se aporte una copia de la publicación o validación correspondiente.

d) Justificación de la necesidad de usar animales para la obtención de los resultados perseguidos con el procedimiento.

e) La especie y el número de animales que se prevé utilizar.

f) La duración del procedimiento y, en su caso, frecuencia de realización prevista.

g) Fecha prevista de inicio y fecha prevista de finalización del procedimiento

h) Destino final de los animales y, en el caso de sacrificio, el método utilizado.

i) La identificación del personal investigador responsable del procedimiento.

j) Los datos del centro responsable de la estabulación de los animales durante el procedimiento, haciendo constar su número de registro correspondiente. Cualquier cambio de ubicación de los animales a otro centro registrado quedará reflejado en el libro de registro de estos.

2. Los centros de titularidad estatal presentarán un informe del comité ético.

3. Circunstancia por la que se necesita la autorización previa y expresa de la autoridad competente, y su justificación.

17345 *REAL DECRETO 1202/2005, de 10 de octubre, sobre el transporte de mercancías perecederas y los vehículos especiales utilizados en estos transportes.*

El Acuerdo sobre transportes internacionales de mercancías perecederas y sobre vehículos especiales utilizados en estos transportes (ATP), hecho en Ginebra el 1 de septiembre de 1970 y publicado en el «Boletín Oficial del Estado» de 22 de noviembre de 1976, establece las medidas tendentes a asegurar la mejora de las condiciones de conservación y calidad de las mercancías perecederas durante su transporte, en especial en el transcurso de los intercambios internacionales.

Este real decreto tiene por finalidad que la regulación contenida en dicho acuerdo internacional sea también de estricta aplicación al transporte en el territorio nacional, lo cual no sólo contribuirá a hacer más seguro el comercio de mercancías perecederas, sino que, además, será lógicamente un elemento positivo para el desarrollo de este comercio.

Durante su tramitación en fase de proyecto, este real decreto, además de contar con la aprobación de la Comisión para la coordinación del transporte de mercancías perecederas, ha sido informado por la Dirección General de Transportes por Carretera, el Pleno del Departamento de Mercancías del Comité Nacional de Transporte por Carretera, la Sección de Transporte de Mercancías del Consejo Nacional de Transportes Terrestres, las Secreta-

rias Generales Técnicas de todos los ministerios proponentes y la Dirección General de Cooperación Autonómica del Ministerio de Administraciones Públicas.

Lo establecido en este real decreto se dicta al amparo de las competencias exclusivas del Estado de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 149.1.13.^a, 16.^a y 21.^a de la Constitución, que atribuye al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación de la planificación general de la actividad económica, sanidad exterior y bases y coordinación general de la sanidad y, por último, ferrocarriles y transportes terrestres que transcurran por el territorio de más de una comunidad autónoma.

En su virtud, a propuesta de la Ministra de Fomento y de los Ministros de Asuntos Exteriores y de Cooperación, del Interior, de Industria, Turismo y Comercio, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 7 de octubre de 2005,

DISPONGO:**Artículo 1. *Ámbito de aplicación.***

Las normas vigentes en España en cada momento del Acuerdo sobre transporte de mercancías perecederas y sobre vehículos especiales utilizados en estos transportes (ATP) serán de aplicación a los transportes que se realicen dentro del territorio nacional, sin perjuicio de lo establecido en las normas sobre seguridad alimentaria y de lo dispuesto en el Real Decreto 237/2000, de 18 de febrero, por el que se establecen las especificaciones técnicas que deben cumplir los vehículos especiales para el transporte terrestre de productos alimentarios a temperatura regulada y los procedimientos para el control de conformidad con las especificaciones.

Asimismo, se aplicarán al transporte interno las normas contenidas en los acuerdos internacionales bilaterales o multilaterales que, conforme a lo dispuesto en el ATP, sean suscritos por España.

Artículo 2. *Definiciones.*

A los efectos de este real decreto, se entenderá por:

a) ATP: Acuerdo sobre transportes internacionales de mercancías perecederas y sobre vehículos especiales utilizados en estos transportes, hecho en Ginebra el 1 de septiembre de 1970.

b) Mercancías perecederas: aquellas mercancías incluidas en el ATP, cuyo transporte haya de ser realizado en vehículos bajo temperatura dirigida y que estén especificadas en el citado acuerdo internacional.

c) Transporte: toda operación de transporte por cuenta propia o ajena, realizada total o parcialmente en el territorio nacional.

d) Vehículos bajo temperatura dirigida: vehículos isoterms, refrigerantes, frigoríficos o caloríficos, que satisfagan las definiciones y normas enunciadas en el anejo 1 del ATP.

Disposición final primera. *Títulos competenciales.*

Este real decreto se dicta al amparo de lo establecido en el artículo 149.1.13.^a, 16.^a y 21.^a de la Constitución, que atribuye al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación de la planificación general de la actividad económica, sanidad exterior y bases y coordinación general de la sanidad y, por último, ferrocarriles y transportes terrestres que transcurran por el territorio de más de una comunidad autónoma.

I. Disposiciones generales

JEFATURA DEL ESTADO

19321 *LEY 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.*

JUAN CARLOS I

REY DE ESPAÑA

A todos los que la presente vieren y entendieren.

Sabed: Que las Cortes Generales han aprobado y Yo vengo en sancionar la siguiente ley.

PREÁMBULO

I

La Unión Europea establece de forma taxativa la obligación de regular el correspondiente régimen sancionador en caso de incumplimiento de la normativa de bienestar animal, pudiéndose citar a estos efectos el artículo 55 del Reglamento (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar animal. Más recientemente el artículo 25 del Reglamento (CE) n° 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y operaciones conexas, por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) n° 1255/1997, que deroga la Directiva 91/628/CEE del Consejo, de 19 de noviembre de 1991.

En este contexto, las principales obligaciones, en lo que se refiere a los animales de producción, derivan de la Directiva 91/628/CEE del Consejo, de 19 de noviembre de 1991, sobre la protección de los animales durante el transporte, que modifica las Directivas 90/425/CEE y 91/496/CEE; de la Directiva 91/629/CEE del Consejo, de 19 de noviembre de 1991, relativa a las normas mínimas para la protección de terneros; de la Directiva 91/630/CEE del Consejo, de 19 de noviembre de 1991, relativa a las normas mínimas para la protección de cerdos; de la Directiva 98/58/CE del Consejo de 20 de julio de 1998, relativa a la protección de los animales en las explotaciones ganaderas; de la Directiva 1999/74/CE del Consejo de 19 de julio de 1999, por la que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras y de la Directiva 93/119/CE del Consejo, de 23 de diciembre de 1993, relativa a la protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza. En lo que se refiere a animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, debe tenerse en cuenta la Directiva 86/609/CEE, del Consejo de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproxima-

ción de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Asimismo, las obligaciones que son exigibles tanto para los responsables de los animales como para los operadores comerciales, se prevén en el Reglamento (CE) n° 1255/97 del Consejo, de 25 de junio de 1997, sobre los criterios comunitarios que deben cumplir los puntos de parada y por el que se adapta el plan de viaje mencionado en el Anexo de la Directiva 91/628/CEE, en la Decisión 2000/50/CE, de 19 de diciembre, de la Comisión, relativa a los requisitos mínimos para la inspección de las explotaciones ganaderas, y, a partir del 5 de enero de 2007, en el Reglamento (CE) n° 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre.

Las obligaciones previstas en la anterior normativa comunitaria se concretan en las siguientes normas básicas estatales: el Real Decreto 1047/1994, de 20 de mayo, relativo a las normas mínimas para la protección de terneros, en el Real Decreto 54/1995, de 20 de enero, sobre protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza, el Real Decreto 1041/1997, de 27 de junio, por el que se establecen las normas relativas a la protección de los animales durante su transporte, el Real Decreto 348/2000, de 10 de marzo, por el que se incorpora al ordenamiento jurídico la Directiva 98/58/CE, relativa a la protección de los animales en las explotaciones ganaderas, el Real Decreto 3/2002, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras, el Real Decreto 1135/2002, de 31 de octubre, relativo a las normas mínimas para la protección de cerdos, el Real Decreto 751/2006, de 16 de junio, sobre autorización y registro de transportistas y medios de transporte de animales, por el que se crea el Comité español de bienestar y protección de los animales de producción, y el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

II

Mediante esta Ley se establece, en acatamiento del mandato comunitario, un conjunto de principios sobre el cuidado de los animales y el cuadro de infracciones y sanciones que dota de eficacia jurídica a las obligaciones establecidas en la normativa aplicable. Se logra así, con esta Ley dar cumplimiento además al artículo 25 de la Constitución que estipula la reserva de ley en la regulación de las infracciones y sanciones.

Esta Ley también estipula las bases del régimen sancionador. Con ello se logra establecer un común denominador normativo en el cual las Comunidades Autónomas ejerzan sus competencias. Ese común denominador garantiza la uniformidad necesaria para la operatividad

de la normativa aplicable y asegura una proporcionalidad mínima en las sanciones.

El carácter básico de las normas y de las infracciones y sanciones contenidas en esta Ley es consecuencia de la reserva que los artículos 149.1.13.^a y 16.^a de la Constitución hacen a favor del Estado en materia de bases y coordinación de la planificación general de la actividad económica y bases y coordinación general de la sanidad.

III

La ley se estructura en tres títulos, completados con una disposición adicional y seis disposiciones finales.

El título preliminar se refiere al objeto de la ley, que es establecer las bases de un régimen de protección animal y de infracciones y sanciones para garantizar el cumplimiento de las normas sobre protección de los animales en la explotación, el transporte, la experimentación y el sacrificio. Se regula así, también, la potestad sancionadora de la Administración General de Estado en lo que respecta a la protección de los animales exportados o importados desde o hacia Estados no miembros de la Unión Europea y a los procedimientos con animales de laboratorio que sean de su competencia.

En este mismo título se definen aquellos términos, citados en el articulado, que precisan una determinación y concreción de sus caracteres y alcance, y se delimita su ámbito de aplicación, excluyéndose la caza y la pesca, la fauna silvestre, los espectáculos taurinos, las competiciones deportivas regladas y los animales de compañía, excepto lo establecido en la disposición adicional primera, ya que poseen su propia normativa reguladora.

El título I regula los aspectos más relevantes sobre la explotación, el transporte de los animales, su sacrificio o su matanza. Se determinan, asimismo, las actividades sujetas a autorización administrativa o notificación previa a la Administración competente.

Las previsiones contempladas en los títulos anteriores devendrían ineficaces sin la existencia de un régimen de inspecciones y controles, así como de infracciones y sanciones, aspectos estos últimos a los que atiende el título II, dividido en tres capítulos.

El capítulo I establece las reglas generales sobre los planes y programa de inspección y control, el régimen del personal inspector y las obligaciones de la inspección.

El capítulo II se destina a las infracciones y sanciones. Con carácter básico se han configurado las infracciones muy graves, graves y leves por incumplimiento de la normativa en la materia.

Respecto de las sanciones, habida cuenta de su naturaleza básica se establece su contenido sancionador mínimo y máximo.

TÍTULO PRELIMINAR

Disposiciones generales

Artículo 1. *Objeto.*

Esta Ley tiene por objeto:

a) Establecer las normas básicas sobre explotación, transporte, experimentación y sacrificio para el cuidado de los animales y un régimen común de infracciones y sanciones para garantizar su cumplimiento.

b) Regular la potestad sancionadora de la Administración General del Estado sobre exportación e importación de animales desde o hacia Estados no miembros de la Unión Europea en lo que respecta a su atención y cui-

dado y sobre los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en procedimientos de su competencia.

Artículo 2. *Ámbito de aplicación.*

1. Esta Ley se aplicará a los animales vertebrados de producción o que se utilicen para experimentación y otros fines científicos.

2. Esta Ley no se aplicará a:

a) La caza y la pesca.

b) La fauna silvestre, incluida aquella existente en los parques zoológicos que se regulan por la Ley 31/2003, de 27 de octubre, de conservación de la fauna silvestre en los parques zoológicos, sin perjuicio de lo previsto en el artículo 14.1.f) de esta Ley.

c) Los espectáculos taurinos previstos en los artículos 2 y 10 de la Ley 10/1991, de 4 de abril, sobre potestades administrativas en materia de espectáculos taurinos, y las competiciones deportivas regladas incluidas las actuaciones precisas para el control del dopaje de los animales.

d) Los animales de compañía, sin perjuicio de lo previsto en la disposición adicional primera de esta Ley.

Artículo 3. *Definiciones.*

A los efectos de esta Ley, se entenderá por:

a) Animales de producción: los animales de producción, reproducción, cebo o sacrificio, incluidos los animales de peletería o de actividades cinegéticas, mantenidos, cebados o criados, para la producción de alimentos o productos de origen animal, o para cualquier otro fin comercial o lucrativo.

b) Animales utilizados para experimentación y otros fines científicos: los animales vertebrados utilizados o destinados a ser utilizados en los procedimientos.

c) Procedimiento: toda utilización de un animal para la experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia, lesión o daño, incluida toda actuación que de manera intencionada o casual pueda dar lugar al nacimiento de un animal en las condiciones anteriormente mencionadas. Se considera, asimismo, procedimiento la utilización de los animales, aun cuando se eliminen el dolor, el sufrimiento, la lesión, la angustia o el daño, mediante el empleo de anestesia, analgesia u otros métodos. Quedan excluidos los métodos admitidos en la práctica moderna (métodos humanitarios) para el sacrificio y para la identificación de los animales. Se entiende que un procedimiento comienza en el momento en que se inicia la preparación de un animal para su utilización y termina cuando ya no se va a hacer ninguna observación ulterior para dicho procedimiento.

d) Experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia: aquella que utilice los animales con los siguientes fines:

1.º La investigación científica, incluyendo aspectos como la prevención de enfermedades, alteraciones de la salud y otras anomalías o sus efectos, así como su diagnóstico y tratamiento en el hombre, los animales o las plantas; el desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos y alimenticios y otras sustancias o productos, así como la realización de pruebas para verificar su calidad, eficacia y seguridad.

2.º La valoración, detección, regulación o modificación de las condiciones fisiológicas en el hombre, en los animales o en las plantas.

3.º La protección del medio ambiente natural, en interés de la salud o del bienestar del hombre o los animales y del mantenimiento de la biodiversidad.

4.º La educación y la formación.

5.º La investigación médico-legal.

No se entenderán incluidas a estos efectos, sin perjuicio de la aplicación de las normas relativas a animales de producción, las prácticas agropecuarias no experimentales y la clínica veterinaria.

e) Autoridad competente: los órganos correspondientes de las Comunidades Autónomas y de las Ciudades de Ceuta y Melilla; los órganos correspondientes de la Administración General del Estado en materia de comercio y sanidad exteriores; y los órganos de las entidades locales en las funciones propias o complementarias que la legislación encomiende a dichas entidades.

f) Explotación: cualquier instalación, construcción o, en el caso de cría al aire libre, cualquier lugar en los que se tengan, críen o manejen animales de producción, o se utilicen animales para experimentación u otros fines científicos. A estos efectos, se entenderán incluidos los mataderos y otros lugares en que se realice el sacrificio de animales, los centros de concentración, los puestos de control, los centros o establecimientos destinados a la utilización de animales para experimentación u otros fines científicos y los circos.

TÍTULO I

Explotación, transporte, experimentación y sacrificio de animales

Artículo 4. *Explotaciones de animales.*

Las Administraciones Públicas adoptarán las medidas necesarias para asegurar que, en las explotaciones, los animales no padezcan dolores, sufrimientos o daños inútiles.

Para ello, se tendrán en cuenta su especie y grado de desarrollo, adaptación y domesticación, así como sus necesidades fisiológicas y etológicas de acuerdo con la experiencia adquirida, los conocimientos científicos y la normativa comunitaria y nacional de aplicación en cada caso.

Artículo 5. *Transporte de animales.*

1. Las Administraciones Públicas adoptarán las medidas necesarias para que solo se transporten animales que estén en condiciones de viajar, para que el transporte se realice sin causarles lesiones o un sufrimiento innecesario, para la reducción al mínimo posible de la duración del viaje y para la atención de las necesidades de los animales durante el mismo.

2. Los medios de transporte y las instalaciones de carga y descarga se concebirán, construirán, mantendrán y utilizarán adecuadamente, de modo que se eviten lesiones y sufrimiento innecesarios a los animales y se garantice su seguridad.

3. El personal que manipule los animales estará convenientemente formado o capacitado para ello y realizará su cometido sin recurrir a la violencia o a métodos que puedan causar a los animales temor, lesiones o sufrimientos innecesarios.

Artículo 6. *Sacrificio o matanza de animales.*

1. Las normas sobre la construcción, las instalaciones y los equipos de los mataderos, así como su funcionamiento, evitarán a los animales agitación, dolor o sufrimiento innecesarios.

2. El sacrificio de animales fuera de los mataderos se hará únicamente en los supuestos previstos por la normativa aplicable en cada caso y de acuerdo con los requisitos fijados por ésta, a excepción de los sacrificios de animales llevados a cabo por veterinarios con fines diagnósticos.

3. Cuando el sacrificio de los animales se realice según los ritos propios de Iglesias, Confesiones o Comunidades religiosas inscritas en el Registro de Entidades Religiosas, y las obligaciones en materia de aturdimiento sean incompatibles con las prescripciones del respectivo rito religioso, las autoridades competentes no exigirán el cumplimiento de dichas obligaciones siempre que las prácticas no sobrepasen los límites a los que se refiere el artículo 3 de la Ley Orgánica 7/1980, de 5 de julio, de Libertad Religiosa.

En todo caso, el sacrificio conforme al rito religioso de que se trate se realizará bajo la supervisión y de acuerdo con las instrucciones del veterinario oficial.

El matadero deberá comunicar a la autoridad competente que se va a realizar este tipo de sacrificios para ser registrado al efecto, sin perjuicio de la autorización prevista en la normativa comunitaria.

Artículo 7. *Centros o establecimientos destinados a la cría, suministro o uso de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia.*

Los centros o establecimientos destinados a la cría, suministro o uso de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, deben estar autorizados o inscritos en el correspondiente registro administrativo, con carácter previo al inicio de su actividad.

Artículo 8. *Autorizaciones y registros administrativos.*

Los transportistas de animales, sus vehículos, contenedores o medios de transporte deben disponer de la correspondiente autorización y estar registrados, en los términos que reglamentariamente se determinen.

Artículo 9. *Importaciones de animales vivos.*

En el caso de importaciones desde terceros países de animales vivos la Administración General del Estado exigirá el cumplimiento de las obligaciones fijadas en la normativa europea.

TÍTULO II

Inspecciones, infracciones y sanciones

CAPÍTULO I

Inspecciones

Artículo 10. *Planes y programas de inspección y control.*

Las Administraciones Públicas, en el ámbito de sus respectivas competencias, establecerán los programas o planes periódicos de inspecciones y controles oficiales

que se precisen, sin perjuicio de las inspecciones que resulten necesarias ante situaciones o casos singulares.

Artículo 11. *Personal inspector.*

Para el desempeño de las funciones inspectoras concernientes a la materia a la que se refiere esta Ley, el personal al servicio de las Administraciones Públicas deberá tener cualificación y formación suficiente para el ejercicio de estas tareas. Asimismo, tendrá el carácter de agente de la autoridad, pudiendo recabar de las autoridades competentes y, en general, de quienes ejerzan funciones públicas, incluidas las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado o cuerpos policiales autonómicos y locales, el concurso, apoyo y protección que le sean precisos.

Artículo 12. *Obligaciones del inspeccionado.*

Las personas físicas o jurídicas a quienes se practique una inspección estarán obligadas a:

- a) Permitir el acceso de los inspectores a todo establecimiento, explotación, instalación, vehículo, contenedor o medio de transporte, o lugar en general, con la finalidad de realizar su actuación inspectora, siempre que aquéllos se acrediten debidamente ante el empresario, su representante legal o persona debidamente autorizada o, en su defecto, ante cualquier empleado que se hallara presente en el lugar. Si la inspección se practicase en el domicilio de una persona física, deberán obtener su consentimiento expreso o, en su defecto, la preceptiva autorización judicial previa.
- b) Suministrar toda clase de información sobre instalaciones, productos, animales, servicios y, en general, sobre aquellos aspectos relativos a la protección animal que se le solicitaran, permitiendo su comprobación por los inspectores.
- c) Facilitar que se obtenga copia o reproducción de la información en materia de protección animal.
- d) Permitir la práctica de diligencias probatorias del incumplimiento de la normativa vigente en materia de protección animal.
- e) En general, a consentir y colaborar en la realización de la inspección.
- f) En todo caso, el administrado tendrá derecho a mostrar y ratificar su disconformidad respecto a lo recogido en el acta de inspección.

CAPÍTULO II

Infracciones

Artículo 13. *Calificación de infracciones.*

Las infracciones se califican como muy graves, graves o leves, atendiendo a los criterios de riesgo o daño para los animales y al grado de intencionalidad.

Artículo 14. *Infracciones.*

1. Son infracciones muy graves las siguientes:
 - a) El sacrificio o muerte de animales en espectáculos públicos fuera de los supuestos expresamente previstos en la normativa aplicable en cada caso o expresa y previamente autorizados por la autoridad competente.
 - b) El incumplimiento de las obligaciones exigidas por las normas de protección animal en cuanto al cuidado

y manejo de los animales, cuando concurra la intención de provocar la tortura o muerte de los mismos.

- c) Utilizar los animales en peleas.
- d) Utilizar animales en producciones cinematográficas, televisivas, artísticas o publicitarias, incluso con autorización de la autoridad competente, cuando se produzca la muerte de los mismos.
- e) El incumplimiento de la obligación de aturdimiento previo, cuando no concurra el supuesto establecido en el artículo 6.3.
- f) La realización de un procedimiento sin la autorización previa de la autoridad competente, cuando se utilicen animales incluidos en el apéndice I del Convenio sobre comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres, CITES.
- g) Provocar, facilitar o permitir la salida de los animales de experimentación u otros fines científicos del centro o establecimiento, sin autorización por escrito del responsable del mismo, cuando dé lugar a la muerte del animal o cree un riesgo grave para la salud pública.
- h) Suministrar documentación falsa a los inspectores o a la Administración.
- i) Utilizar perros o gatos vagabundos en procedimientos.
- j) Liberación incontrolada y voluntaria de animales de una explotación.

2. Son infracciones graves las siguientes:

- a) Las mutilaciones no permitidas a los animales.
- b) Reutilizar animales en un procedimiento cuando la normativa aplicable no lo permita o conservar con vida un animal utilizado en un procedimiento cuando la normativa aplicable lo prohíba.
- c) Realizar cualquiera de las actividades reguladas en esta Ley sin contar con la autorización administrativa o la inscripción registral exigible según las normas de protección animal aplicables.
- d) El incumplimiento de las obligaciones exigidas por las normas de protección animal en cuanto al cuidado y manejo de los animales, cuando produzca lesiones permanentes, deformaciones o defectos graves de los mismos.
- e) La oposición, obstrucción o falta de colaboración con la actuación inspectora y de control de las Administraciones Públicas, cuando se impida o dificulte gravemente su realización.

3. Son infracciones leves:

- a) El incumplimiento de obligaciones exigidas por las normas de protección animal en cuanto al cuidado y manejo de los animales, siempre que no se produzcan lesiones permanentes, deformidades o defectos graves, o la muerte de los animales.
- b) El incumplimiento de las obligaciones en cuanto a la forma, métodos y condiciones para el sacrificio o matanza de animales, excepto el aturdimiento, cuando no concurra el supuesto establecido en el artículo 6.3.
- c) Abandonar a un animal, con el resultado de la ausencia de control sobre el mismo o su efectiva posesión.
- d) La oposición, obstrucción o falta de colaboración con la actuación inspectora y de control de las Administraciones Públicas, cuando no impida o dificulte gravemente su realización.

Artículo 15. *Reincidencia.*

1. Existe reincidencia si se produce la comisión de más de una infracción de la misma naturaleza en el término de un año y así se declara en la nueva resolución

sancionadora, siempre que asimismo la primera resolución sancionadora fuera firme en vía administrativa. La fecha a partir de la cual se contará dicho plazo será el día que conste en autos que cometió la primera infracción o, si es continuada, desde el día que dejó de cometerla.

2. La reincidencia tendrá como consecuencia el incremento de la sanción correspondiente.

Artículo 16. Sanciones.

1. Por la comisión de infracciones en materia de protección de los animales, podrán imponerse las siguientes sanciones:

a) En el caso de infracciones muy graves, se aplicará una multa de, al menos, 6.001 euros y hasta un límite máximo de 100.000 euros.

b) En el caso de infracciones graves, se aplicará una multa de, al menos, 601 euros y hasta un límite máximo de 6.000 euros.

c) En el caso de infracciones leves, se aplicará una sanción de multa hasta un límite máximo de 600 euros o apercibimiento en su defecto.

2. Cuando un solo hecho sea constitutivo de dos o más infracciones, se sancionará solamente por la más grave.

3. Los ingresos procedentes de las sanciones se destinarán a actuaciones que tengan por objeto la protección de los animales.

Artículo 17. Sanciones accesorias.

La comisión de infracciones graves y muy graves puede llevar aparejada la imposición de las siguientes sanciones accesorias:

a) Medidas de corrección, seguridad o control, que impidan la continuidad en la producción del daño.

b) Decomiso de los animales. El órgano sancionador determinará el destino definitivo del animal, con sujeción a los principios de bienestar y protección animal.

c) Cese o interrupción de la actividad, en el caso de sanciones muy graves.

d) Clausura o cierre de establecimientos, en el caso de sanciones muy graves.

Artículo 18. Graduación de las sanciones.

1. Las sanciones pecuniarias se graduarán en función de los siguientes criterios: los conocimientos, el nivel educativo y otras circunstancias del responsable, el tamaño y la ubicación geográfica de la explotación, el grado de culpa, el beneficio obtenido o que se esperase obtener, el número de animales afectados, el daño causado a los animales, el incumplimiento de advertencias previas y la alarma social que pudiera producirse.

2. Si, en razón de las circunstancias concurrentes, se apreciara una cualificada disminución de la culpabilidad del imputado, el órgano sancionador podrá establecer la cuantía de la sanción aplicando la escala relativa a la clase de infracciones de menor gravedad que aquella en que se integra la considerada.

3. El órgano sancionador podrá reducir la cuantía de la sanción pecuniaria hasta en un 20 por cien si el presunto infractor reconoce la comisión de la infracción, una vez recibida la notificación de la incoación del procedimiento sancionador, sin efectuar alegaciones ni proponer prueba alguna.

Asimismo, podrá incrementar la cuantía hasta en un 50 por ciento si el infractor es reincidente. Si la reinci-

dencia concurre en la comisión de infracciones leves, no procederá la sanción de apercibimiento.

Artículo 19. Competencia sancionadora.

1. El ejercicio de la potestad sancionadora en aplicación de la presente Ley corresponderá a los órganos competentes de las Comunidades Autónomas o de las Ciudades de Ceuta y Melilla, y a la Administración General del Estado, en el ámbito de sus respectivas competencias.

2. Cuando se trate de infracciones en importaciones o exportaciones de animales, o en materia de procedimientos que sean competencia de la Administración General del Estado, la iniciación del procedimiento corresponderá al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y la instrucción al órgano de dicho Ministerio que tenga atribuidas las funciones en materia de protección animal.

3. La resolución correspondiente a los supuestos contemplados en el apartado anterior, será dictada por:

a) El Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación en los supuestos de infracciones leves y graves, sin perjuicio de la posibilidad de delegación.

b) El Consejo de Ministros en los supuestos de infracciones muy graves.

Artículo 20. Medidas provisionales.

En los casos de grave riesgo para la vida del animal, podrán adoptarse medidas provisionales para poner fin a la situación de riesgo para el animal, antes de la iniciación del procedimiento sancionador. Entre otras, podrán adoptarse las siguientes:

a) La incautación de animales.

b) La no expedición, por parte de la autoridad competente de documentos legalmente requeridos para el traslado de animales.

c) La suspensión o paralización de las actividades, instalaciones o medios de transporte y el cierre de locales, que no cuenten con las autorizaciones o registros preceptivos.

Artículo 21. Medidas no sancionadoras.

No tendrán carácter de sanción la clausura o cierre de establecimientos o instalaciones que no cuenten con las previas autorizaciones o registros preceptivos, o la suspensión de su funcionamiento hasta tanto se subsanen los defectos o se cumplan los requisitos exigidos por razones de protección animal.

Artículo 22. Multas coercitivas.

En el supuesto de que el interesado no ejecute las medidas provisionales, cumpla las sanciones impuestas o las medidas previstas en el artículo 21, la autoridad competente podrá requerir a los afectados para que, en un plazo suficiente, procedan al cumplimiento de aquéllas, con apercibimiento de que, en caso contrario, se impondrá una multa coercitiva, con señalamiento de cuantía y hasta un máximo de 6.000 euros.

Disposición adicional primera. Protección de los animales de compañía y domésticos.

1. Será aplicable a los animales de compañía y domésticos lo dispuesto en el artículo 5 en tanto el transporte se realice de forma colectiva y con fines económicos.

2. Serán igualmente de aplicación a los animales de compañía y domésticos las infracciones y sanciones tipificadas en los artículos 14.1, párrafos a), b), c), d), e), h), i) y j), 14.2, párrafos a), c), d) y e), 14.3 y 16.1.

Disposición adicional segunda. *Tasa por la prestación de servicios y gestión de permisos y certificados en el ámbito del Convenio sobre el Comercio Internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES).*

1. Se crea la Tasa por la prestación de servicios y expedición de documentos CITES que se regirá por la presente Ley y por las demás fuentes normativas que para las tasas se establecen en la Ley 8/1989, de 13 de abril, de Tasas y Precios Públicos.

2. Hecho imponible: La realización por la Administración General del Estado de las actuaciones referidas a la expedición de permisos y certificados CITES previstos en el Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES) y en el Reglamento (CE) n° 338/1997, del Consejo, de 9 de diciembre de 1996, relativo a la protección de especies de fauna y flora silvestres mediante el control de su comercio.

3. Base imponible: Las solicitudes de permisos o certificados para especímenes de fauna y flora CITES de acuerdo con la descripción que se contiene en el punto 6.

4. Devengo de la tasa: El momento en que se presente la solicitud que inicie el expediente, que no se realizará ni tramitará sin que se haya efectuado previamente el pago correspondiente.

5. Sujetos pasivos: Las personas físicas o jurídicas que soliciten la prestación de servicios que constituyen el hecho imponible de las mismas.

6. Determinación de la cuota:

Uno. La cuantía de la tasa a ingresar será:

a) Por Permisos CITES de importación de hasta 4 especies: 20 euros que se incrementará en 5 euros más por especie.

b) Por Permisos CITES de exportación de hasta 4 especies: 20 euros que se incrementará en 5 euros más por especie.

c) Por Certificados CITES de reexportación de hasta 4 especies: 20 euros que se incrementará en 5 euros más por especie.

d) Por Certificados de propiedad privada de hasta 4 especies: 30 euros que se incrementará en 5 euros más por especie.

e) Por Certificados de uso comunitario: 20 euros.

f) Por Certificados de exhibición itinerante: 10 euros.

7. Exenciones: Quedan exentos del abono de tasas los organismos e instituciones oficiales pertenecientes a cualquiera de las Administraciones Públicas.

8. Autoliquidación y pago:

Uno. La tasa será objeto de autoliquidación por parte del sujeto pasivo, que habrá de acompañar justificante de su pago a la solicitud del permiso o certificado.

Dos. El pago de la tasa se realizará en efectivo por el procedimiento establecido en la normativa que regula la gestión recaudatoria de las tasas de la Hacienda Pública.

9. Gestión y recaudación: La gestión de la tasa se llevará a cabo por la Secretaría General de Comercio Exterior del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio.

Disposición final primera. *Modificación de la Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal.*

La Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal, queda modificada como sigue:

Uno. Se añade un nuevo párrafo al artículo 36.1, del siguiente tenor:

«A efectos de la autorización prevista en el párrafo anterior, la autoridad competente verificará el cumplimiento de los requisitos exigibles en materia de protección animal. En todo caso, las explotaciones en que los animales descansen en el curso de un viaje deberán estar autorizadas y registradas por la autoridad competente en materia de protección animal.»

Dos. Se añade un nuevo párrafo al artículo 89.1, del siguiente tenor:

«No obstante lo dispuesto en el párrafo anterior, si, en razón de las circunstancias concurrentes, se apreciara una cualificada disminución de la culpabilidad del imputado, el órgano sancionador podrá establecer la cuantía de la sanción aplicando la escala relativa a la clase de infracciones de menor gravedad que aquélla en que se integra la considerada en el caso de que se trate.»

Disposición final segunda. *Títulos competenciales.*

1. Esta Ley se dicta al amparo del artículo 149.1.13.^a y 16.^a de la Constitución, que atribuye al Estado competencia exclusiva en materia de bases y coordinación de la planificación general de la actividad económica y de bases y coordinación general de la sanidad.

2. Se exceptúan de lo dispuesto en el apartado anterior:

a) Los artículos 1 b), 10 y 19 y el régimen de inspecciones, infracciones y sanciones correspondientes a las importaciones y exportaciones que se dicta al amparo de la competencia exclusiva del Estado en materia de sanidad exterior, de acuerdo con el artículo 149.1.16.^a de la Constitución.

b) La disposición adicional segunda se dicta al amparo de la competencia exclusiva que el artículo 149.1.14.^a de la Constitución reconoce al Estado en materia de Hacienda General.

Disposición final tercera. *Actualización de sanciones.*

El Gobierno podrá, mediante real decreto, actualizar las sanciones pecuniarias tipificadas en el artículo 16, de acuerdo con la variación anual del Índice de Precios al Consumo.

Disposición final cuarta. *Reconocimiento de la formación de los investigadores de centros que utilicen animales para experimentación u otros fines científicos.*

El Ministerio de Educación y Ciencia establecerá en el plazo de dos meses desde la entrada en vigor de esta Ley, un procedimiento excepcional para acreditar que los investigadores poseen la formación y experiencia adecuada para la experimentación con animales. La aplicación de este procedimiento se extenderá hasta un año después de la entrada en vigor de la ley.

Disposición final quinta.

Lo dispuesto en los artículos 6.3, 14.1, letras a), c) y d), 14.2.a), 16.3 y en el apartado 2 de la Disposición Adicional primera de esta ley, es aplicable en tanto en cuanto las Comunidades Autónomas con competencia estatutariamente asumida en esta materia no dicten su propia normativa.

Disposición final sexta. *Entrada en vigor.*

La presente Ley entrará en vigor al mes de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Por tanto,

Mando a todos los españoles, particulares y autoridades, que guarden y hagan guardar esta ley.

Madrid, 7 de noviembre de 2007.

JUAN CARLOS R.

El Presidente del Gobierno,
JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ ZAPATERO

19322 *LEY 33/2007, de 7 de noviembre, de reforma de la Ley 15/1980, de 22 de abril, de creación del Consejo de Seguridad Nuclear.*

JUAN CARLOS I

REY DE ESPAÑA

A todos los que la presente vieren y entendieren.

Sabed: Que las Cortes Generales han aprobado y Yo vengo en sancionar la siguiente ley.

PREÁMBULO

La creación del Consejo de Seguridad Nuclear, mediante la Ley 15/1980, de 22 de abril, como el único Organismo competente en materia de seguridad nuclear y protección radiológica, independiente de la Administración General del Estado, constituyó un hito fundamental en el desarrollo de la seguridad nuclear en España y permitió equiparar el marco normativo español en materia de energía nuclear a los de los países más avanzados en este campo.

Aunque dicha Ley ha sido modificada en algunos aspectos –principalmente, por la Ley 14/1999, de 4 de mayo, de Tasas y Precios Públicos por servicios prestados por el Consejo de Seguridad Nuclear–, el tiempo transcurrido desde su promulgación aconseja su actualización al objeto de tener en cuenta la experiencia adquirida durante este periodo, de incorporar las modificaciones puntuales que se han venido realizando en su articulado, de adaptarla a la creciente sensibilidad social en relación con el medio ambiente, y de introducir o desarrollar algunos aspectos con el fin de garantizar el mantenimiento de su independencia efectiva y reforzar la transparencia y la eficacia de dicho Organismo.

Dadas las funciones que el Consejo de Seguridad Nuclear tiene encomendadas, es fundamental que sus actuaciones cuenten con la necesaria credibilidad y confianza por parte de la sociedad a la que tiene la misión de proteger contra los efectos indeseables de las radiaciones ionizantes.

Con este objetivo, es necesario establecer los mecanismos oportunos para que el funcionamiento del Consejo de Seguridad Nuclear se lleve a cabo en las necesarias condiciones de transparencia que favorezcan dicha

confianza. En línea con lo establecido en el conocido como Convenio Aarhus, ratificado por España el 15 de diciembre de 2004 y en la Ley 27/2006, de 18 de julio, por la que se regulan los derechos de acceso a la información, de participación pública y de acceso a la justicia en materia de medio ambiente, en la que se garantiza el derecho de los ciudadanos al acceso a la información, la participación de la sociedad en el funcionamiento de dicho Organismo y el derecho a la interposición de recursos.

Se desarrollan las definiciones en el ámbito de los instrumentos normativos del Consejo de Seguridad Nuclear, se refuerza su papel en el ámbito de la protección física de los materiales y las instalaciones nucleares y radiactivas y, al objeto de garantizar la independencia requerida, se precisan los requisitos que ha de cumplir la contratación de servicios externos.

Por otra parte, atendiendo al objetivo fundamental de que el funcionamiento de las instalaciones nucleares y radiactivas se lleve a cabo en las máximas condiciones de seguridad posibles, se establece la obligación para sus trabajadores de comunicar cualquier hecho que pueda afectar al funcionamiento seguro de las mismas protegiéndolos de posibles represalias.

Por último, en esta Ley se contempla el establecimiento de un Comité Asesor, como órgano de asesoramiento y consulta, abierto a la participación de representantes de los ámbitos institucionales, territoriales, científicos, técnicos, empresariales, sindicales y medioambientales, cuya misión será emitir recomendaciones al Consejo de Seguridad Nuclear para mejorar la transparencia, el acceso a la información y la participación pública en las materias de su competencia.

Artículo único. *Modificación de la Ley 15/1980, de 22 de abril, de creación del Consejo de Seguridad Nuclear.*

1. Se modifica el artículo 1 de la Ley 15/1980, de 22 de abril, de creación del Consejo de Seguridad Nuclear, quedando redactado como sigue:

«Artículo 1.

1. Se crea el Consejo de Seguridad Nuclear como ente de Derecho Público, independiente de la Administración General del Estado, con personalidad jurídica y patrimonio propio e independiente de los del Estado, y como único organismo competente en materia de seguridad nuclear y protección radiológica.

Se regirá por un Estatuto propio elaborado por el Consejo y aprobado por el Gobierno, de cuyo texto dará traslado a las Comisiones competentes del Congreso y del Senado antes de su publicación, y por cuantas disposiciones específicas se le destinen, sin perjuicio de la aplicación supletoria de los preceptos de la legislación común o especial.

2. El Consejo elaborará el anteproyecto de su presupuesto anual, de acuerdo con lo previsto en la Ley General Presupuestaria y lo elevará al Gobierno para su integración en los Presupuestos Generales del Estado.»

2. Se modifica el artículo 2 de la Ley 15/1980, de 22 de abril, de creación del Consejo de Seguridad Nuclear, quedando redactado como sigue:

«Artículo 2.

Las funciones del Consejo de Seguridad Nuclear serán las siguientes:

a) Proponer al Gobierno las reglamentaciones necesarias en materia de seguridad nuclear y protección radiológica, así como las revisiones que considere convenientes. Dentro de esta reglamentación se establecerán los criterios objetivos para la

COMUNIDAD AUTONOMA DE CATALUÑA

19103 LEY 5/1995, de 21 de junio, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas.

EL PRESIDENTE DE LA GENERALIDAD DE CATALUÑA

Sea notorio a todos los ciudadanos que el Parlamento de Cataluña ha aprobado y yo, en nombre del Rey y de acuerdo con lo que establece el artículo 33.2 del Estatuto de Autonomía de Cataluña, promulgo la siguiente Ley 5/1995, de 21 de junio, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas.

La presente Ley, cuya finalidad es la protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas, pretende complementar el marco jurídico existente en Cataluña para la protección de los animales, constituido por la Ley 3/1988, de 4 de marzo, de protección de los animales, y las disposiciones que la desarrollan. Al mismo tiempo, con su promulgación se da cumplimiento al mandato establecido por la citada Ley 3/1988, de adoptar una normativa específica en una materia de una amplitud y una complejidad tales que requieren un trato normativo diferenciado.

La Ley se inscribe, también en esta ocasión, en la línea de la legislación más avanzada existente no sólo en el seno de la Unión Europea, sino también en el ámbito más amplio del Consejo de Europa, en cuyo marco se firmó en el año 1986 el Convenio europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con finalidades experimentales y otras finalidades científicas.

En el ámbito comunitario, la Directiva 86/609/CEE, de 24 de noviembre, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otras finalidades científicas, constituye el encuadramiento normativo de las medidas reglamentarias de ámbito estatal.

Dentro de este contexto, el carácter innovador de esta norma de rango legal se pone de manifiesto en el establecimiento de medidas específicas destinadas a garantizar y asegurar el cumplimiento de las obligaciones que impone y, en especial, en atención al compromiso que adopta la Generalidad de impulsar la investigación y el desarrollo de técnicas alternativas susceptibles de aportar unos niveles de información y unos resultados científicos equivalentes a los obtenidos en procedimientos de experimentación con animales.

La presente Ley se inspira en el principio de prohibición de prácticas de experimentación con animales, siempre que exista algún método alternativo de reconocida fiabilidad.

En cuanto al contenido, la Ley se estructura en seis capítulos, una disposición transitoria, una disposición final y un anexo.

El capítulo I, sobre las disposiciones generales, establece la finalidad y el ámbito de aplicación de la Ley.

El capítulo II, dedicado a los animales de experimentación, establece la prohibición de utilizar determinados animales y las condiciones generales de mantenimiento y de transporte.

El capítulo III, referido a los centros de cría o de suministro de animales de experimentación y a aquellos en los que se realizan los procedimientos de experimentación, regula las condiciones que han de cumplir en cada caso el registro de control de los animales y el registro administrativo en el que han de inscribirse los centros.

El capítulo IV, núcleo central de la Ley, contiene las prescripciones relativas a los procedimientos de experimentación propiamente dichos, a su selección, a los métodos de eliminación del dolor, a la liberación de los animales durante el procedimiento, al mantenimiento en vida de los mismos después del procedimiento y también a la utilización de animales en más de un procedimiento.

El capítulo V establece el régimen de autorizaciones y control que ha de ejercer el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, con la colaboración de otros agentes de la autoridad, el principio de la salvaguarda del carácter confidencial de la información, la creación de la Comisión de Experimentación Animal y la obligación de creación, por parte de los centros, de los comités éticos de experimentación animal.

Finalmente, el capítulo VI, dedicado a la disciplina, tipifica las infracciones a lo dispuesto en la Ley y las correspondientes sanciones.

CAPITULO I

Disposiciones generales

Artículo 1. Objeto de la Ley.

La presente Ley tiene por objeto la protección de los animales utilizados o destinados a ser utilizados con finalidades experimentales, científicas o educativas, para evitar que pueda causárseles algún tipo de dolor o sufrimiento injustificados, para evitar cualquier duplicación inútil de procedimientos de experimentación y para reducir al mínimo el número de animales utilizados.

Artículo 2. Ambito de aplicación.

1. A efectos de la presente Ley, se entiende por «animal» cualquier ser vivo vertebrado no humano, incluidas las formas de desarrollo de vida propia y autónoma, con exclusión de las formas fetales y embrionarias.

2. Únicamente pueden utilizarse animales en procedimientos de experimentación cuando se pretenda conseguir alguno de los siguientes objetivos:

a) 1. La prevención de enfermedades, de alteraciones de la salud o de otras anomalías y de sus efectos en las personas, en los animales vertebrados e invertebrados y en las plantas, incluidos el desarrollo, la producción y las pruebas para comprobar la calidad, la eficacia y la seguridad de medicamentos y alimentos y de otras sustancias o productos que puedan tener incidencia en la salud.

a) 2. La diagnosis y el tratamiento de enfermedades, de alteraciones de la salud o de otras anomalías y de sus efectos en las personas, en los animales vertebrados e invertebrados y en las plantas.

b) La evaluación, la detección, la regulación y la modificación de las condiciones fisiológicas en las personas, en los animales vertebrados e invertebrados y en las plantas.

c) La protección del medio ambiente, en interés de la salud o el bienestar de las personas, de los animales o de las plantas.

d) La investigación fundamental y la investigación aplicada.

e) La educación universitaria y la formación profesional específica para el ejercicio de actividades relacionadas con la experimentación en los términos que se establecen en el artículo 12.3.

3. Se excluye del ámbito de aplicación de la presente Ley el ejercicio de la actividad ganadera y veterinaria no experimentales.

CAPITULO II

Animales de experimentación

Artículo 3. *Animales de experimentación.*

1. A efectos de la presente Ley, se entiende por «animal de experimentación» el animal utilizado o destinado a ser utilizado en cualquier procedimiento de experimentación.

2. Los animales de las especies incluidas en el anexo I, para ser utilizados o destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación han de haber nacido y haber sido criados expresamente en centros oficialmente reconocidos. Excepcionalmente, si los objetivos de un procedimiento de experimentación lo requieren y los centros oficialmente reconocidos no disponen de los animales necesarios, el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca puede autorizar la utilización de animales de las citadas especies que no provengan de estos centros.

Artículo 4. *Prohibición de utilización de determinados animales.*

1. Se prohíbe someter a los procedimientos de experimentación regulados en la presente Ley:

a) A los perros y gatos vagabundos y a los provenientes de centros de recogida de animales abandonados.

b) A los animales salvajes capturados en la naturaleza.

c) A los animales protegidos o en peligro de extinción.

2. El Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca puede autorizar, con carácter excepcional, la utilización de los animales a que se refieren las letras b) y c) del apartado 1 si lo permite la normativa específica de protección, siempre que los objetivos del procedimiento sean la investigación tendente a la protección de estas especies u otros fines biomédicos esenciales y se compruebe que las citadas especies son excepcionalmente las únicas adecuadas para la finalidad que se pretende. A tal efecto, con carácter previo a la autorización, ha de presentarse una Memoria descriptiva del procedimiento de experimentación y de los objetivos que se persiguen.

Artículo 5. *Condiciones generales de mantenimiento y transporte de los animales.*

1. Los animales destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación han de gozar en todo momento, de conformidad con la normativa comunitaria, de las siguientes condiciones:

a) Disponer de un alojamiento, en las debidas condiciones ambientales, con un grado suficiente de libertad de movimiento, suficiente cantidad de alimentos y de agua y las condiciones higiénico-sanitarias que sean adecuadas a su salud y su bienestar, de acuerdo con las necesidades de cada especie.

b) Beneficiarse de medidas de control y verificación, a cargo de personal cualificado, que garanticen que cualquier defecto o sufrimiento que padezcan sean eliminados rápidamente.

2. El traslado de los animales destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación ha de ajustarse en todo momento a lo dispuesto en la normativa legal vigente sobre protección de los animales en el transporte. Durante el traslado, los animales han de disponer de espacio suficiente y adecuado a su especie, en medios de transporte o embalajes que han de ser concebidos para proteger a los animales de la intem-

perie, de los cambios bruscos de temperatura y de las temperaturas extremas.

3. Durante el transporte, los animales han de ser abrebados y han de recibir una alimentación apropiada a intervalos convenientes, teniendo en cuenta las características de las especies transportadas y los medios de transporte utilizados.

4. Para la carga y la descarga de los animales ha de utilizarse un equipo adecuado que garantice su bienestar durante estas tareas.

5. De acuerdo con la normativa comunitaria vigente, el Gobierno de la Generalidad ha de desarrollar por reglamento las condiciones generales establecidas en los apartados anteriores.

CAPITULO III

Centros

Artículo 6. *Condiciones generales de los centros.*

1. Los centros que alojen animales destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación han de cumplir los requisitos que permitan proporcionarles las condiciones a que se refiere el artículo 5 y han de disponer de personal cualificado y suficiente encargado de supervisar su salud y su bienestar.

2. Ha de establecerse por reglamento la normativa que han de cumplir los centros a que se refiere el apartado 1, en cuanto a la identificación de los animales de experimentación y a la acreditación de su origen y de su estado sanitario.

Artículo 7. *Condiciones específicas de los centros que realizan procedimientos de experimentación.*

Los centros que realizan procedimientos de experimentación han de disponer de personal adecuado y de instalaciones y equipos apropiados para las especies animales que se utilicen y para la ejecución eficaz de los procedimientos, de forma que utilicen el mínimo número de animales y les produzcan el mínimo dolor, sufrimiento, angustia o daños duraderos.

Artículo 8. *Registro de los centros.*

1. Los centros que críen, suministren o utilicen animales de experimentación han de estar inscritos en el registro que con esta finalidad ha de establecer el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca como requisito imprescindible para su funcionamiento.

2. En el plazo de seis meses desde la entrada en vigor de la presente Ley ha de regularse por reglamento el procedimiento para formalizar la inscripción a que se refiere el apartado 1.

Artículo 9. *Registro de control de los animales.*

1. Los centros a que se refiere el artículo 8 tienen la obligación de llevar un registro en el que han de hacer constar el número de animales que crían, suministran o utilizan, las especies a que pertenecen, los establecimientos de origen y destino de estos animales y los demás datos que se determinen por reglamento.

2. La información registral de los animales ha de mantenerse en el centro, a disposición de los técnicos del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, durante un plazo de cinco años a contar desde la última anotación efectuada.

CAPITULO IV

Procedimientos de experimentación

Artículo 10. *Definición del procedimiento de experimentación.*

1. A efectos de la presente Ley, se entiende por «procedimiento de experimentación» la utilización de un

animal con finalidades experimentales, científicas o educativas que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia o daños duraderos, incluida cualquier actuación que pueda dar lugar al nacimiento de un animal en las citadas condiciones, pero con exclusión de los métodos menos dolorosos aceptados por la práctica moderna para sacrificar o identificar a los animales.

2. Un procedimiento de experimentación comienza en el momento en que se inicia la preparación del animal para utilizarlo y acaba en el momento en que no ha de realizarse ninguna observación ulterior en relación al mismo procedimiento. La eliminación del dolor, el sufrimiento, la angustia o los daños duraderos mediante la utilización satisfactoria de analgésicos, de anestesia o de otros métodos no excluye la utilización de un animal del ámbito de esta definición.

Artículo 11. *Ejecución de los procedimientos de experimentación.*

1. De acuerdo con lo establecido en el artículo 8, los procedimientos de experimentación han de realizarse en los centros registrados a tal fin y por parte de personal cualificado o bajo su responsabilidad directa.

2. Con carácter excepcional, el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca puede autorizar la ejecución de procedimientos de experimentación fuera de los centros registrados, si es imprescindible por las características del procedimiento, y siempre que quede garantizado el cumplimiento de las condiciones establecidas en el presente capítulo.

3. Todos los animales utilizados en procedimientos de experimentación han de ser mantenidos en las condiciones que se establecen en el artículo 5.1, siempre que sea compatible con las finalidades del procedimiento.

Artículo 12. *Selección del procedimiento de experimentación.*

1. Se prohíbe la ejecución de procedimientos de experimentación que requieran la utilización de animales en los casos en los que pueda recurrirse a otro método alternativo oficialmente validado por las instituciones o los organismos comunitarios que tengan encomendada esta función, o reconocido de acuerdo con la normativa comunitaria, que sea factible para obtener unos resultados equivalentes.

2. En caso de que exista la posibilidad de realizar varios procedimientos de experimentación para obtener la misma finalidad, ha de seleccionarse el que requiera la utilización de menor número de animales o bien de animales con menor grado de sensibilidad neurovegetativa, que cause menos dolor, sufrimiento, angustia o daños duraderos y que pueda proporcionar los resultados más satisfactorios.

3. Los procedimientos de experimentación con finalidades educativas sólo pueden realizarse en la educación universitaria y en la formación profesional específica para el ejercicio de actividades relacionadas con la experimentación. En cualquier caso, estos procedimientos de experimentación han de limitarse a los absolutamente necesarios y únicamente pueden realizarse si el objetivo no puede conseguirse por métodos audiovisuales o por otros métodos adecuados de valor comparable.

4. La Generalidad ha de impulsar la investigación y el desarrollo de técnicas alternativas que puedan aportar unos niveles de información y unos resultados científicos equivalentes a los obtenidos en procedimientos de experimentación con animales y la validación de los procedimientos que se ajusten a los principios establecidos en la presente Ley, y ha de facilitar los intercambios de información y la difusión de las técnicas que eviten procedimientos repetitivos o reiterativos.

Artículo 13. *Liberación de animales durante el procedimiento de experimentación.*

Cuando sea necesario para fines experimentales o científicos, el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca puede autorizar la liberación de los animales durante el procedimiento de experimentación, siempre que exista la certeza de que se les ha aplicado el máximo cuidado para proteger su bienestar y de que no existe peligro para la salud pública, la fauna, la flora y el medio ambiente.

Artículo 14. *Eliminación del dolor.*

1. Los animales, durante los procedimientos de experimentación, han de estar adecuadamente anestesiados, bajo el efecto de analgésicos o sometidos a otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia.

2. Lo establecido en el apartado 1 no se aplica si:

a) La utilización de anestesia, de analgesia o de los demás métodos posibles es más traumática para el animal que el propio procedimiento.

b) La utilización de anestesia, de analgesia o de los demás métodos posibles es incompatible con los resultados perseguidos por el procedimiento o está contraindicada con los mismos, en cuyo supuesto es precisa la autorización previa del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca.

3. El animal que, después de haberse recuperado de la anestesia, la analgesia o el método que se le haya aplicado, pueda padecer dolor o sufrimiento considerables ha de ser tratado a tiempo con medios adecuados para calmarle el dolor o el sufrimiento, siempre que ello sea compatible con la finalidad del procedimiento de experimentación; si no es posible su tratamiento, el animal ha de ser sacrificado inmediatamente por métodos humanitarios que no conlleven dolor, ni estrés, ni sufrimiento físico o psíquico.

Artículo 15. *Mantenimiento en vida posteriormente al procedimiento de experimentación.*

1. Al finalizar el procedimiento de experimentación el personal cualificado del centro ha de decidir si el animal puede ser mantenido vivo o ha de ser sacrificado por métodos humanitarios que no conlleven dolor, ni estrés, ni sufrimiento físico o psíquico. En ningún caso puede mantenerse vivo a un animal, aunque haya recuperado su estado normal de salud, si es probable que padezca posteriormente dolor, sufrimiento o angustia duraderos.

2. Si el personal cualificado del centro decide mantener vivo a un animal, éste ha de recibir los cuidados adecuados a su estado de salud, bajo control veterinario, y ha de ser mantenido en las condiciones que se establecen en el artículo 5.1.

3. Si en el procedimiento de experimentación se han utilizado animales capturados en la naturaleza, el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca puede autorizar su liberación al medio originario, previa estancia en un centro de recuperación, bajo control de personal cualificado, siempre que éste dictamine que el animal ha restablecido la salud en todos los aspectos y no exista peligro para la salud pública, la fauna y el medio ambiente.

Artículo 16. *Utilización de animales en más de un procedimiento de experimentación.*

1. Se prohíbe la utilización en procedimientos de experimentación de animales que hayan sido sometidos

previamente a otro procedimiento que les haya ocasionado dolor o sufrimiento graves o duraderos, con independencia de que se haya usado anestesia o analgesia, salvo que los animales hayan recuperado totalmente su estado normal de salud y bienestar.

2. La excepción que se establece en el apartado 1, que ha de ser autorizada por el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, requiere en cualquier caso que durante el nuevo procedimiento de experimentación el animal se halle sometido a anestesia general, que ha de mantenerse hasta su sacrificio, o que el nuevo procedimiento sólo exija intervenciones de poca importancia.

CAPITULO V

Régimen de autorizaciones y de control

Artículo 17. *Notificaciones y autorizaciones.*

1. La utilización de animales de experimentación con las finalidades que se establecen en el artículo 2 ha de ser notificada previamente al Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, de acuerdo con lo que se establezca por reglamento.

2. Sin perjuicio de lo que se establece en el apartado 1, la ejecución de procedimientos de experimentación en los supuestos excepcionales previstos en los artículos 3.2, 4.2, 11.2, 13, 14.2.b) y 15.3 de la presente Ley y la ejecución de procedimientos de experimentación en los que el animal pueda padecer un dolor grave y prolongado requieren la autorización expresa del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, el cual puede establecer las condiciones que considere pertinentes para asegurar que se cumplan las prescripciones de la presente Ley.

Artículo 18. *Control del cumplimiento de la Ley.*

1. Corresponde al Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, mediante su personal, ejercer las funciones de inspección, control y vigilancia del cumplimiento de la presente Ley.

2. A efectos de lo que se establece en el apartado 1, los responsables de los centros sometidos a la presente Ley tienen la obligación de facilitar al personal del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca el acceso a sus instalaciones y la información y la documentación que les requieran en relación a la cría, el mantenimiento o la utilización de los animales de experimentación.

3. Los agentes de la autoridad han de colaborar con el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca en las tareas a que se refieren los apartados 1 y 2.

Artículo 19. *Entrega de información estadística.*

1. Los centros en los que se realizan procedimientos de experimentación han de proporcionar al Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca toda la información relativa a la utilización de animales en los procedimientos de experimentación, en orden a la elaboración de las correspondientes estadísticas, de acuerdo con lo que se establezca por reglamento. El Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca ha de hacer públicos anualmente los datos estadísticos.

2. En cualquier caso ha de garantizarse la salvaguarda del carácter confidencial de la información recibida.

Artículo 20. *Comisión de Experimentación Animal.*

1. Se crea la Comisión de Experimentación Animal, integrada por personas con conocimientos y experiencia

en esta materia, cuya finalidad es el asesoramiento y el seguimiento de lo que determina la presente Ley.

2. El Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca ha de determinar la composición y el funcionamiento de la Comisión de Experimentación Animal, que ha de ajustarse a lo que se establece con carácter general para los órganos colegiados, garantizando que estén representados en la misma los distintos sectores relacionados con la protección de los animales y la experimentación animal.

3. Todos los datos entregados a la Comisión de Experimentación Animal con motivo del cumplimiento de las prescripciones de la presente Ley y de las disposiciones que la desarrollan tienen el carácter de confidenciales.

Artículo 21. *Comités éticos de experimentación animal.*

1. Los centros que utilicen animales de experimentación están obligados a crear comités éticos de experimentación animal, los cuales han de velar por el cuidado y el bienestar de los animales de experimentación. El Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca ha de establecer por reglamento la composición y las funciones de estos comités, de forma que se garanticen la experiencia y los conocimientos técnicos del personal que los integre. En cualquier caso, se ha de garantizar que alguno de sus miembros no tenga relación directa con el centro o con el procedimiento de experimentación de que se trate.

2. El reglamento a que se refiere el apartado 1, en atención a la organización, la capacidad y la estructura de los centros, puede establecer criterios para eximirlos de la obligación de crear los comités éticos de experimentación animal. En tales casos, el reglamento ha de establecer los mecanismos de control adecuados, a los cuales han de someterse los centros citados en forma análoga a la de los centros que dispongan de comités éticos de experimentación animal.

CAPITULO VI

Régimen disciplinario

Artículo 22. *Tipificación de las infracciones.*

1. La vulneración de las prescripciones de la presente Ley tiene la consideración de infracción administrativa.

2. Las infracciones de la presente Ley se clasifican en leves, graves y muy graves.

3. Son infracciones leves:

a) El incumplimiento de la obligación de notificar al registro a que se refiere el artículo 8 la modificación de los datos relativos al personal y a la titularidad de los centros.

b) El hecho de que los centros no tengan o lleven incorrectamente el registro de control a que se refiere el artículo 9.

c) La falta de la notificación de los procedimientos de experimentación exigida en el artículo 17.1.

d) El hecho de no suministrar o de entregar defectuosamente la información estadística a que se refiere el artículo 19.

e) En general, el incumplimiento de las prescripciones de la presente Ley que no esté calificado como infracción grave o muy grave.

4. Son infracciones graves:

a) La falta de inscripción de los centros en el registro a que se refiere el artículo 8 o la falsificación de los datos que han de figurar en el mismo.

b) El incumplimiento de las obligaciones asumidas por los centros en relación a su inscripción en el registro.

c) El incumplimiento de las condiciones generales de mantenimiento y de protección de los animales durante el transporte establecidas en el artículo 5.

d) El incumplimiento por parte de los centros de los requerimientos exigidos en los artículos 6 y 7.

e) La ejecución de procedimientos de experimentación por parte de personal no cualificado o sin la responsabilidad directa de personal cualificado.

f) La ejecución de procedimientos de experimentación vulnerando lo dispuesto en el artículo 11.3.

g) La ejecución de procedimientos de experimentación contraviniendo a lo dispuesto en el artículo 12.

h) La infracción de las normas establecidas en el artículo 15.2 en relación al mantenimiento en vida de un animal después de un procedimiento de experimentación.

i) El incumplimiento de las condiciones exigidas por el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca en las autorizaciones a que se refieren los artículos 3.2 y 17.2.

j) El hecho de negarse o de resistirse a facilitar los datos y la información requeridos por el personal cualificado, el hecho de suministrar información inexacta y el hecho de falsificar la documentación a que se refiere el artículo 9.1.

k) El hecho de no disponer de los comités éticos de experimentación animal que sean preceptivos o de incumplir las exigencias establecidas por reglamento en esta cuestión.

l) El traslado, la liberación o el sacrificio de animales que hayan sido cautelarmente intervenidos por los funcionarios competentes.

m) El hecho de no facilitar el acceso del personal del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca a los centros de experimentación animal y de no proporcionarle la información y la documentación que requiera en relación a la utilización, la cría o el mantenimiento de los animales.

5. Son infracciones muy graves:

a) El hecho de utilizar animales en procedimientos de experimentación con finalidades distintas a las especificadas en el artículo 2.

b) El hecho de utilizar o de destinar a ser utilizados en cualquier procedimiento de experimentación perros y gatos vagabundos o provenientes de centros de recogida de animales abandonados.

c) El hecho de utilizar o de destinar a ser utilizados en procedimientos de experimentación los animales a que se refieren las letras b) y c) del artículo 4.1 sin disponer de la preceptiva autorización, y el hecho de facilitar datos falseados para obtener dicha autorización.

d) La ejecución de procedimientos de experimentación vulnerando lo dispuesto en el artículo 14.

e) La liberación de un animal de experimentación poniendo en peligro la salud pública, la fauna o el medio ambiente.

f) El hecho de mantener en vida a un animal al final de un procedimiento de experimentación si ha de padecer dolor, sufrimiento, tensión, angustia o recuerdo doloroso duradero.

g) El hecho de utilizar en un procedimiento de experimentación un animal que haya sido utilizado en un procedimiento anterior que le haya causado dolor o sufrimiento grave y prolongado, incumpliendo las condiciones que se establecen en el artículo 16.

h) El hecho de no utilizar en el sacrificio de un animal de experimentación métodos humanitarios que no conlleven dolor ni estrés ni sufrimiento físico o psíquico.

Artículo 23. Prescripción.

1. Los plazos de prescripción de las infracciones son de dos años para las muy graves, de un año para las graves y de seis meses para las leves, a contar desde la fecha de comisión de la infracción.

2. Los plazos de prescripción de las sanciones son los mismos que se establecen en el apartado 1 para las respectivas infracciones, a contar desde la fecha en la que la resolución sancionadora adquiera firmeza.

Artículo 24. Tramitación.

1. El procedimiento sancionador ha de ajustarse al procedimiento vigente.

2. Si se aprecia que los hechos objeto de un expediente sancionador pueden ser constitutivos de delito o falta, la Administración ha de trasladar las actuaciones a la autoridad judicial competente y dejar en suspenso el procedimiento sancionador hasta que ésta se pronuncie.

3. La sanción de la autoridad judicial a que se refiere el apartado 2 excluye la imposición de sanciones administrativas. Si la resolución judicial es absolutoria, la Administración puede continuar la tramitación del expediente sancionador, respetando los hechos que los Tribunales hayan declarado probados.

Artículo 25. Graduación de las sanciones.

1. Las infracciones de lo dispuesto en la presente Ley son sancionadas con las siguientes multas, que han de incrementarse en cualquier caso hasta el total del beneficio obtenido por el infractor:

a) Las infracciones leves, con una multa de 10.000 a 100.000 pesetas.

b) Las infracciones graves, con una multa de 100.001 a 2.000.000 de pesetas.

c) Las infracciones muy graves, con una multa de 2.000.001 a 15.000.000 de pesetas.

2. En la imposición de las sanciones, para graduar la cuantía de las multas, han de tenerse en cuenta los siguientes criterios:

a) La trascendencia social de la infracción y el perjuicio o el sufrimiento causados al animal.

b) La cuantía del beneficio ilícito obtenido con la comisión de la infracción.

c) El dolo, la culpa o la reincidencia en la comisión de la infracción.

3. La comisión de una infracción por un miembro de un comité ético de experimentación animal conlleva su separación y su inhabilitación para formar parte de otros comités en el futuro.

4. Ante la reincidencia en la comisión de infracciones tipificadas como muy graves, el Gobierno puede imponer a los responsables de las infracciones la prohibición de realizar las actividades sometidas a la presente Ley, por un período máximo de cinco años.

Artículo 26. Responsabilidad e indemnizaciones.

La imposición de cualquiera de las sanciones establecidas en la presente Ley no excluye la responsabilidad civil del sancionado ni la indemnización que pueda exigirsele por daños y perjuicios.

Artículo 27. Competencia.

1. Son competentes para acordar la incoacción de los procedimientos sancionadores y designar al instructor de los mismos los órganos que determina en cada caso la legislación sobre protección de los animales.

2. Son competentes para la imposición de las sanciones los siguientes órganos:

a) Los Delegados territoriales del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, para las leves.

b) El Director general del Medio Natural y el Director general de Producción e Industrias Agroalimentarias, para las graves.

c) El Consejero de Agricultura, Ganadería y Pesca, para las muy graves.

d) El Gobierno de la Generalidad, para las que como consecuencia del mayor beneficio obtenido por el infractor, resulten de cuantía superior a las muy graves, y para las que, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 25.4, conlleven la inhabilitación del infractor.

Artículo 28. Decomiso de los animales.

1. Mediante sus agentes, la Administración puede decomisar los animales objeto de protección en el mismo momento en que existan indicios racionales de infracción de las disposiciones de la presente Ley.

2. El decomiso a que se refiere el apartado 1 tiene el carácter de preventivo hasta la resolución del correspondiente expediente sancionador, que en cualquier caso ha de determinar el destino final que ha de darse a los animales decomisados.

3. Los gastos ocasionados por el decomiso a que se refiere el apartado 1 y las actuaciones relacionadas con éste van a cuenta del infractor.

Disposición transitoria.

La reglamentación vigente a la entrada en vigor de la presente Ley ha de continuar aplicándose hasta que se adopten las medidas reglamentarias que ésta determina.

Disposición final.

Se faculta al Gobierno de la Generalidad y al Consejero de Agricultura, Ganadería y Pesca para hacer el desarrollo reglamentario de la presente Ley.

Por lo tanto, ordeno que todos los ciudadanos a los que sea de aplicación esta Ley cooperen en su cumplimiento y que los Tribunales y las autoridades a los que corresponda la hagan cumplir.

Palacio de la Generalidad, 21 de junio de 1995:

JORDI PUJOL,
Presidente

ANEXO

Ratón: *Mus musculus*.

Rata: *Rattus norvegicus*.

Cobaya: *Cavia porcellus*.

Hámster dorado: *Mesocricetus auratus*.

Conejo: *Oryctolagus cuniculus*.

Primates no humanos:

Perro: *Canis familiaris*.

Gato: *Felis catus*.

Codorniz: *Coturnix coturnix*.

(Publicada en el «Diario Oficial de la Generalidad de Cataluña» de 10 de julio de 1995)

19104 LEY 6/1995, de 28 de junio, del Jurado de Expropiación de Cataluña.

EL PRESIDENTE DE LA GENERALIDAD DE CATALUÑA

Sea notorio a todos los ciudadanos que el Parlamento de Cataluña ha aprobado y yo, en nombre del Rey y de acuerdo con lo que establece el artículo 33.2 del Estatuto de Autonomía de Cataluña, promulgo la siguiente Ley 6/1995, de 28 de junio, del Jurado de Expropiación de Cataluña.

La vigente Ley de Expropiación Forzosa y su Reglamento regulan la figura del Jurado provincial de Expropiación y atribuyen a este órgano naturaleza administrativa. La composición de dicho Jurado, con mayoría de funcionarios públicos, las atribuciones que tiene conferidas y el carácter de acto administrativo de las resoluciones que dicta, que agotan la vía administrativa, confirman su naturaleza administrativa, y así lo ha ratificado reiteradamente la jurisprudencia.

La Generalidad dispone de la potestad de autoorganización y de la competencia exclusiva para regular las normas de procedimiento administrativo derivadas de la especialidad de su organización, de conformidad con el artículo 9.3 del Estatuto de Autonomía de Cataluña. Asimismo, los artículos 9.8 y 10.1.2 del propio Estatuto otorgan a la Generalidad, respectivamente, competencia exclusiva en materia de régimen local y competencia de desarrollo legislativo en materia de expropiación forzosa.

La potestad expropiatoria es un instrumento indispensable para el ejercicio de diferentes políticas sectoriales estatutarias en relación con las cuales la Generalidad tiene competencia exclusiva, en especial en materia de ordenación del territorio y obras públicas.

En consecuencia, es necesario adecuar a la estructura territorial del Estado, instaurada por la Constitución y por el Estatuto de Autonomía, y a la organización propia de la Generalidad la figura del Jurado de Expropiación como órgano administrativo, mediante la creación de un órgano colegiado que ejerza las funciones de tasación, peritaje y determinación del justiprecio en los expedientes expropiatorios de la Administración de la Generalidad y de las corporaciones locales del ámbito de Cataluña.

Artículo 1. Naturaleza y funciones.

1. Se crea el Jurado de Expropiación de Cataluña, órgano colegiado permanente de naturaleza administrativa, con funciones de tasación, peritaje y fijación del justiprecio en los procedimientos expropiatorios que lleven a cabo, en el ámbito territorial de Cataluña, la Administración de la Generalidad de Cataluña, los organismos autónomos y otros organismos dependientes de la misma, así como los procedimientos expropiatorios que lleven a cabo los entes locales de Cataluña que tienen atribuida potestad expropiatoria.

2. El Jurado de Expropiación ejerce sus funciones de conformidad con las leyes y el resto del ordenamiento jurídico, y, en este sentido, sus resoluciones deben ser necesariamente motivadas y fundamentadas en lo que se refiere a los criterios de valoración seguidos para cada uno de los casos en concreto.

Artículo 2. Composición.

1. El Jurado de Expropiación funciona en cuatro secciones, cuya demarcación corresponde, respectivamente, a los territorios de las provincias actuales de Barcelona, Girona, Lleida y Tarragona.

2. Cada sección del Jurado de Expropiación se compone de los siguientes miembros:

sa administrativa y vista la Orden de 19 de abril de 1995, de delegación de competencias en diversos órganos del Departamento de Economía y Finanzas.

RESUELVO:

Disponer el cumplimiento de la citada Sentencia en sus términos exactos.

Barcelona, 8 de julio de 1997

P.D. (Orden de 19.4.1995, DOGC de 28.4.1995)

XAVIER PADRÓS I CASTILLON
Director de Servicios

(97.176.109)

RESOLUCIÓN

de 8 de julio de 1997, por la que se dispone el cumplimiento de la Sentencia del Tribunal Superior de Justicia de Cataluña dictada en el recurso contencioso administrativo núm. 1925/92.

La Sección 4ª de la Sala de lo Contencioso Administrativo del Tribunal Superior de Justicia de Cataluña, en fecha 30 de enero de 1997, ha dictado Sentencia en el recurso contencioso administrativo núm. 1925/92, interpuesto por la entidad Unión de Operadores, SA, contra la Resolución de 19 de junio de 1992 del Tribunal Económico Administrativo Regional de Cataluña, por el concepto de la tasa fiscal sobre el juego, gravamen complementario 1990.

La parte dispositiva de esta Sentencia establece:

"Fallamos:

"Que debemos estimar y estimamos íntegramente el recurso contencioso administrativo interpuesto por la representación de la entidad Unión de Operadores, SA, contra la Resolución del Tribunal Económico Administrativo Regional de Cataluña, de fecha 19 de junio de 1992, por no ser conforme a derecho y, en su consecuencia, anulamos la expresada resolución, así como los actos administrativos que la misma confirma y condenamos a la Administración demandada a la devolución de las cantidades ingresadas por las autoliquidaciones efectuadas, más los intereses legales.

"Sin hacer especial condena en costas".

Visto lo que disponen los artículos 103 y concordantes de la Ley de la jurisdicción contenciosa administrativa y vista la Orden de 19 de abril de 1995, de delegación de competencias en diversos órganos del Departamento de Economía y Finanzas.

RESUELVO:

Disponer el cumplimiento de la citada Sentencia en sus términos exactos.

Barcelona, 8 de julio de 1997

P.D. (Orden de 19.4.1995, DOGC de 28.4.1995)

XAVIER PADRÓS I CASTILLON
Director de Servicios

(97.176.135)

RESOLUCIÓN

de 9 de julio de 1997, por la que se dispone el cumplimiento de la Sentencia del Tribunal Superior de Justicia de Cataluña dictada en el recurso contencioso administrativo núm. 2229/92.

La Sección 4ª de la Sala de lo Contencioso Administrativo del Tribunal Superior de Justicia de Cataluña, en fecha 6 de febrero de 1997, ha dictado Sentencia en el recurso contencioso administrativo núm. 2229/92, interpuesto por la entidad Unogasa, SA, contra la Resolución de 19 de junio de 1992 del Tribunal Económico Administrativo Regional de Cataluña, por el concepto de la tasa fiscal sobre el juego, gravamen complementario 1990.

La parte dispositiva de esta Sentencia establece:

"Fallamos:

"Que debemos estimar y estimamos íntegramente el recurso contencioso administrativo interpuesto por la representación de Unogasa, SA, contra la Resolución del Tribunal Económico Administrativo Regional de Cataluña, de fecha 19 de junio de 1992, por no ser conforme a derecho y, en su consecuencia, anulamos la expresada resolución, así como los actos administrativos que la misma confirma y en consecuencia acordamos la devolución de las cantidades ingresadas por las autoliquidaciones, ahora impugnadas, practicadas por el gravamen complementario de la tasa de juego correspondiente a 1990 en cumplimiento de lo dispuesto en la Ley 5/1990, de 29 de junio, sobre medidas en materia presupuestaria, financiera y tributaria, en su artículo 38.2, por un importe total de 89.568.000 pesetas, con más los intereses legales correspondientes desde la fecha de su ingreso.

"Sin hacer especial condena en costas".

Visto lo que disponen los artículos 103 y concordantes de la Ley de la jurisdicción contenciosa administrativa y vista la Orden de 19 de abril de 1995, de delegación de competencias en diversos órganos del Departamento de Economía y Finanzas.

RESUELVO:

Disponer el cumplimiento de la citada Sentencia en sus términos exactos.

Barcelona, 9 de julio de 1997

P.D. (Orden de 19.4.1995, DOGC de 28.4.1995)

XAVIER PADRÓS I CASTILLON
Director de Servicios

(97.176.104)

*

**DEPARTAMENTO
DE AGRICULTURA,
GANADERÍA Y PESCA****DECRETO**

214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas.

Con la aprobación de la Ley 5/1995, de 21 de junio, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas es necesario desarrollar por reglamento determinadas cuestiones referentes a las condiciones generales de mantenimiento y transporte de los animales, a la identificación de los animales de experimentación y a la acreditación de su origen y estado sanitario, al procedimiento para formalizar la inscripción de los centros que críen, suministren o utilicen animales de experimentación en el registro que con esta finalidad debe establecer el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, en el registro de animales que deben llevar estos centros y en el régimen de autorizaciones y control que prevé la Ley.

Igualmente, es necesario también determinar la composición y el funcionamiento de la Comisión de experimentación animal creada por la Ley y de los comités éticos de experimentación que están obligados a crear los centros que utilicen animales de experimentación.

Este desarrollo se efectúa en el marco de las directivas 86/609/CEE, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otras finalidades científicas, 91/628/CEE, de 9 de noviembre de 1991, sobre la protección de los animales durante el transporte y 92/65/CEE, de 13 de julio, por la que se establecen las condiciones de policía sanitaria aplicables a los intercambios y a las importaciones en la Comunidad, de animales, esperma, óvulos y embriones no sometidos a la sección I del Anexo A de la Directiva 90/425/CEE.

Este Decreto es de aplicación a los centros de cría, a los de suministro, a los laboratorios y a los centros de experimentación con animales inscritos en el Registro de núcleos zoológicos creado por la Orden de 28 de noviembre de 1988, los cuales, en el plazo de 3 meses a partir de la entrada en vigor de este Decreto deben tramitar su inscripción en el Registro de los centros que crea el artículo 2.

De acuerdo con el dictamen de la Comisión Jurídica Asesora:

A propuesta del consejero de Agricultura, Ganadería y Pesca, y de acuerdo con el Gobierno.

DECRETO:**CAPÍTULO I
Terminología****Artículo 1
Definiciones**

A los efectos de esta disposición se entiende por:

1.1 Centro: toda instalación, edificio, grupo de edificios u otros locales, incluidos aquellos no totalmente cerrados o cubiertos, así como las instalaciones móviles y todos aquellos otros medios personales y materiales organizados por su titular para la cría, el suministro o la utilización de animales en procedimientos de experimentación.

1.2 Centro de cría: centro donde nacen y se crían animales destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación.

1.3 Centro suministrador: centro que suministra animales, no criados en el mismo centro, destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación.

1.4 Centro usuario: cualquier centro en el que se utilicen animales para procedimientos de experimentación, incluidos los que realizan procedimientos con finalidades de enseñanza, formación y reciclaje para el ejercicio de una profesión u otras actividades relacionadas.

1.5 Personal para atender los animales: persona o personas encargadas de tener cuidado de los animales y de los aspectos prácticos de su cría y bienestar.

1.6 Personal experimentador: persona o personas que participan en la realización de procedimientos en los que se utilizan animales de experimentación.

1.7 Personal investigador: persona o personas con titulación universitaria superior específica encargadas del diseño y control de los procedimientos con animales vivos, así como del análisis de sus resultados y de los métodos aplicados para disminuir el sufrimiento del animal.

1.8 Personal asesor en bienestar animal: persona o personas con titulación universitaria superior específica encargadas de supervisar el bienestar y el estado de salud de los animales, así como de las tareas de asesoramiento en relación con el bienestar de los animales.

CAPÍTULO 2

Registro de los centros de cría, suministradores y usuarios

Artículo 2

Creación del Registro

Se crea el Registro de centros de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación, dependiendo de la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias.

Artículo 3

Estructura del Registro

Están obligados a inscribirse en el Registro todos los centros de cría, los centros suministradores y los centros usuarios ubicados dentro del ámbito territorial de Cataluña. El Registro se estructura en las siguientes secciones, en función de las actividades que desarrollen los centros inscritos:

- Centros de cría.
- Centros suministradores.
- Centros usuarios.

En caso que un mismo centro esté integrado por unidades separadas físicamente y con funcionamiento y organización independiente, cada una de estas figurará inscrita con carácter de centro, si bien podrán disponer del mismo Comité ético de experimentación animal.

Artículo 4

Inscripción de datos en el Registro

En el Registro se inscribirán los siguientes datos:

- a) Titular del centro, nombre y, si procede, razón social y número de su DNI o NIF.
- b) Dirección del centro.
- c) Actividad que desarrolla el centro.
- d) Superficie de los locales destinados a alojamiento de los animales.

e) Especies alojadas.

f) Relación del personal especializado al que se refiere el artículo 17, con especificación de su formación, titulación y experiencia.

En caso de centros usuarios universitarios y centros públicos de investigación, únicamente se inscribirá la relación del personal para atender a los animales y del personal asesor en bienestar animal.

g) Cuando se trate de un centro usuario, se inscribirá, además, la composición del Comité ético de experimentación animal.

Artículo 5

Ubicación en las secciones del Registro

5.1 Los centros de cría que realicen además el suministro de los animales criados en sus instalaciones se inscribirán como centros de cría. En el caso de centros de cría que además de suministrar a los animales criados en sus instalaciones, suministren animales procedentes de otros centros de cría, de otros centros suministradores o de otros orígenes, figurarán en el Registro como centro de cría y centro suministrador.

5.2 A efectos de inscripción en el Registro cuando los centros usuarios críen animales para ser utilizados en sus instalaciones, sólo deberán inscribirse como centros usuarios, si bien deberán ajustarse también a las normas establecidas para los centros de cría.

Artículo 6

Solicitud de inscripción y modificación de datos inscritos

Los centros de cría, suministradores y usuarios deben solicitar la inscripción en el Registro con carácter previo al inicio de su funcionamiento. Cualquier modificación de los datos que figuren inscritos, derivada de ampliaciones, reducciones, traslados, cambios de personal u otras circunstancias, así como en caso de suspensión o cese de la actividad o de cambio de titularidad, deberá ser notificada a la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias en el plazo máximo de un mes desde que se haya producido, para que se efectúe la correspondiente modificación registral.

Artículo 7

Documentación requerida para la inscripción de los centros en el Registro

Para su inscripción en este Registro, los responsables de los centros deben presentar a la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias la siguiente documentación:

- a) Impreso normalizado de solicitud, debidamente cumplimentado.
- b) Impreso normalizado de la memoria descriptiva de las características del centro y de las actividades que en él se desarrollan.
- c) Programa higiénico-sanitario que prevea todas las medidas de control establecidas por la normativa vigente.
- d) La relación del personal especializado al que se refiere el artículo 17, con especificación de su formación y titulación y, si procede, experiencia.

En caso de centros usuarios universitarios y centros públicos de investigación, únicamente debe presentarse la relación del personal para atender a los animales y del personal asesor en bienestar animal.

e) En el caso que se trate de un centro usuario, la composición del Comité ético de experimentación animal.

Artículo 8

Tramitación de las solicitudes de inscripción en los registros

8.1 Examinada la documentación, si se observan defectos o carencias se comunicarán al interesado para que proceda a su enmienda en el plazo máximo de un mes. Si se cumplen todos los requisitos establecidos y previa visita técnica de inspección, se dictará Resolución de inscripción en el Registro, en la cual se podrán establecer obligaciones específicas para determinados tipos de centros, de acuerdo con lo que establece el artículo 38.

8.2 La solicitud de inscripción se entenderá desestimada si una vez transcurridos tres meses desde la fecha de su presentación no se ha dictado resolución expresa.

CAPÍTULO 3

Control de los animales en los centros

Artículo 9

Registro de control de los animales

9.1 Los centros de cría, suministradores y usuarios deben llevar un Registro de control de los animales en el cual deberán anotarse los siguientes datos:

- a) El nombre y el número de Registro del centro.
- b) El número de animales presentes en el centro en el momento de abrir este Registro indicando la especie o especies a que pertenecen.
- c) Las entradas y salidas de los animales, nacimientos y defunciones, haciendo constar, en este caso, la causa de la muerte, con indicación de la especie, el nombre, la fecha, el origen y el destino, la identificación de los centros de origen o de destino, y, además, en el caso de centros usuarios, si los animales han sido utilizados en procedimientos de experimentación.
- d) Las observaciones efectuadas durante el período de aislamiento y observación de los animales que provienen del exterior del centro.
- e) Los resultados de los exámenes periódicos o de cualquier otro método de diagnóstico efectuado a los animales.
- f) Los casos de enfermedad y los tratamientos administrados.

g) En caso de realizar necropsias, sus resultados.

h) En el caso que los animales criados, suministrados o utilizados en procedimientos de experimentación sean perros, gatos o primates, se hará constar la identificación individual.

9.2 Los centros que críen especies sometidas al Decreto 61/1994, de 22 de febrero, sobre regulación de las explotaciones ganaderas, podrán utilizar como libro de Registro el libro de explotación ganadera, en el cual los datos establecidos en las letras b) y c) del apartado anterior, se harán constar en las hojas de movimiento pecuario y las establecidas en las letras d), e), f) y g) en las hojas de incidencias.

Artículo 10

Modalidades de Registro de control de los animales

10.1 El Registro de control de los animales se puede instrumentar en un libro con hojas fijas numeradas correlativamente, en fichas numeradas correlativamente, o bien en apoyo informático que permita en cualquier momento, a requerimiento del personal del Departamento

de Agricultura, Ganadería y Pesca, hacer la impresión de los datos que contenga.

10.2 Para llevar el Registro de control de los animales mediante apoyo informático es necesaria autorización previa de la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias. Esta autorización será retirada cuando se compruebe que el programa correspondiente no se ajusta a lo que establece el artículo 9 o cuando por cualquier circunstancia el personal del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca no pueda realizar las comprobaciones oportunas.

10.3 El Registro de control de los animales debe encontrarse permanentemente en el centro y a disposición del personal del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca.

CAPÍTULO 4

Centros de cría, suministradores y usuarios

Artículo 11

Instalaciones y equipos de los centros

11.1 Los centros de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación, además de lo que establece la Ley 5/1995, deben disponer de lo siguiente:

a) Locales o dependencias con sistemas adecuados para el alojamiento de los animales.

b) Locales o dependencias específicos para el aislamiento y la observación de los animales enfermos o heridos y de aquellos que provengan del exterior del centro.

c) Locales o dependencias adecuados para el almacenaje de alimentos, de jaulas y otros instrumentos relacionados con la experimentación.

d) Sistemas oportunos de recogida o tratamiento y eliminación de cadáveres, de excrementos y de otros residuos, con suficientes garantías higiénico-sanitarias, de acuerdo con lo que establece la normativa vigente.

11.2 Los centros usuarios deben disponer, además, de instalaciones adecuadas para realizar necropsias, pruebas sencillas de diagnóstico y toma de muestras.

11.3 Sin perjuicio de lo que establece el apartado primero de este artículo, los centros de cría deben cumplir la normativa vigente sobre ordenación de las explotaciones ganaderas que les sea aplicable.

11.4 Lo que se establece en los apartados anteriores no será de aplicación a los centros suministradores que se dediquen exclusivamente al traslado de animales de un centro de cría a un centro usuario, siempre y cuando los animales no se mantengan en ningún momento en las instalaciones del centro suministrador.

Artículo 12

Requisitos de los locales o dependencias

12.1 Los locales o dependencias para el alojamiento de los animales deben cumplir los siguientes requisitos, de acuerdo con las directrices establecidas en el anexo II de la Directiva 86/609 CEE y C) de la Directiva 92/65/CEE:

a) Ser de fácil limpieza y desinfección, de tal manera que permitan mantener un nivel higiénico satisfactorio.

b) Tener unas características adecuadas a las especies y una capacidad suficiente para el número de animales que se alojen.

c) Disponer de sistemas adecuados para conseguir una ventilación, temperatura, humedad e iluminación adecuadas a las especies alojadas, así como para el aislamiento de los ruidos.

d) Estar diseñados de tal manera que se evite la huida de los animales alojados y el acceso de otros animales.

e) Disponer de áreas independientes para poder alojar de forma separada las especies que requieran condiciones ambientales diferentes o que sean incompatibles entre sí por cualquier característica.

12.2 Los animales deben disponer siempre de agua potable y de alimentos no contaminados. En caso que el local o dependencia esté dotado de sistemas automáticos de bebida, éstos se revisarán y limpiarán regularmente.

Artículo 13

Normas específicas para los elementos y sistemas de alojamiento

Los elementos y los sistemas para el alojamiento de los animales deben ser de fácil limpieza y desinfección y deben proyectarse teniendo en cuenta el bienestar de los animales, de tal manera que no se les pueda ocasionar lesiones, que permitan un cierto grado de libertad de movimientos y limiten al máximo cualquier restricción que pueda dificultar o impedir que el animal satisfaga sus necesidades fisiológicas y etológicas.

Artículo 14

Condiciones ambientales y asistencia veterinaria

14.1 Las condiciones ambientales en las que se crien, custodien o se utilicen los animales de experimentación deben verificarse a diario.

14.2 Sin perjuicio de lo que establece el artículo 17 de este Decreto los centros deberán contar con asistencia veterinaria para controlar la salud de los animales.

14.3 En todo caso debe evitarse el acceso al interior de las instalaciones de personal no autorizado.

CAPÍTULO 5

Traslado de los animales

Artículo 15

Transporte de los animales

15.1 El transporte de los animales utilizados o destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación debe ajustarse, además de lo que disponen las leyes 3/1988, de 4 de marzo, de protección de los animales, y 5/1995, de 21 de junio, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas, a las condiciones de protección que se establecen en este Decreto y en la normativa vigente.

15.2 La documentación sanitaria que debe amparar el traslado de partidas de animales utilizados o destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación durante el transporte es la siguiente:

a) Para los animales de la especie bovina, equina, ovina, cabrera, porcina y las aves no exóticas, procedentes de explotaciones ganaderas: la guía de origen y sanidad pecuaria o documentación sanitaria establecida en la normativa vigente. En todo caso estas explotaciones deberán estar calificadas sanitariamente de acuerdo con la legislación vigente.

b) En el resto de casos, un documento de traslado emitido por el veterinario encargado de controlar la salud de los animales, que tendrá una validez de 5 días, donde deberán figurar, como mínimo, los siguientes datos:

Remitente: en el caso que sea un centro o núcleo zoológico, nombre de su titular, número de Registro y dirección. En caso que sea una explotación ganadera, nombre de su titular, dirección y número de marca oficial.

Destinatario: nombre del centro, número de Registro y dirección.

Lugar de carga.

Medio de transporte.

Especie.

Número de animales.

Identificación, si procede.

Estado sanitario de los animales objeto de traslado, de acuerdo con la normativa que afecte a la especie a trasladar.

Nombre, apellidos y firma del veterinario que extiende el documento.

Fecha.

Artículo 16

Preparación de los animales para su expedición

16.1 Los centros deben preparar a los animales para su expedición en sistemas adecuados que garanticen su bienestar durante el transporte. El transporte de los animales no se realizará si éstos no se encuentran en condiciones de efectuar el trayecto previsto y no se han adoptado las disposiciones oportunas para su cuidado durante el mismo y a la llegada al lugar de destino.

16.2 Los animales enfermos, heridos o sometidos a restricciones de movimiento por cuestiones de policía sanitaria no se considerarán aptos para el transporte, excepto cuando éste haya sido autorizado por el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca por ser imprescindible para las finalidades del procedimiento de experimentación.

16.3 Sin embargo, se podrá realizar el transporte de los animales a que se refiere el párrafo anterior para un tratamiento veterinario o un sacrificio de urgencia, siempre y cuando no conlleve sufrimientos innecesarios o maltrato a los animales.

16.4 Si el animal enfermo o se hiere durante el transporte, debe recibir los primeros auxilios en el plazo más breve posible. Si procede, será sometido a tratamiento veterinario adecuado, y, en caso necesario, sacrificado urgentemente para evitar que sufra innecesariamente, mediante un método humanitario que no conlleve ni dolor, ni estrés, ni sufrimiento físico o psíquico.

CAPÍTULO 6

Personal de los centros de cría, suministradores y usuarios

Artículo 17

Personal especializado de los centros

17.1 Los centros de cría y suministro deben disponer de personal para atender a los animales.

17.2 Los centros usuarios deben disponer, además, de personal experimentador, de personal investigador y de personal asesor en bienestar animal.

En caso que el personal investigador lleve a cabo los procedimientos de experimentación no será necesario disponer de personal experimentador.

Artículo 18

Calificación del personal

18.1 El personal para atender a los animales debe tener una formación en las materias que

se indican en el anexo 1 de este Decreto, obtenida mediante la realización de un curso homologado de acuerdo con la Orden de 25 de enero de 1991 del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca.

18.2 El personal experimentador debe tener una formación universitaria en el área de ciencias, ciencias de la salud o en el área técnica, rama agraria, que debe complementarse con la realización del curso homologado a que se refiere el anexo 2 de este Decreto, o bien, sin perjuicio de lo que establece la disposición transitoria 3a, el personal experimentador debe tener la formación profesional siguiente:

a) Ciclo formativo de explotaciones ganaderas o bien,

b) Ciclo formativo de laboratorio de la familia profesional química, que debe complementarse con la realización del curso homologado a que se refiere el anexo 2 o bien con la superación del módulo de manejo de los animales de experimentación impartido dentro del ciclo formativo al que se refiere el apartado a).

18.3 El personal investigador debe disponer de una licenciatura en biología, medicina, veterinaria, farmacia, psicología o cualquier otra titulación universitaria superior en la que se incluyan enseñanzas específicas en zoología, anatomía y fisiología animales y debe tener una formación de postgrado en las materias que se indican en el anexo 3 de este Decreto.

18.4 El personal asesor en bienestar animal, además de la formación universitaria exigida al personal investigador, debe tener una experiencia mínima de dos años como personal investigador y acreditar una experiencia práctica o una formación especializada en las temáticas que se indican en el anexo 4 de este Decreto.

Artículo 19

Responsabilidad de los procedimientos

Los procedimientos de experimentación sólo pueden ser realizados por personal investigador o experimentador y, en todo caso, se desarrollarán bajo la responsabilidad directa del investigador.

Artículo 20

Normas específicas para el personal asesor

El personal asesor en bienestar de los animales es la persona responsable de las siguientes tareas:

a) Supervisar las instalaciones y, en general, el manejo y cuidado de los animales con el fin de detectar cualquier deficiencia existente.

b) Decidir si al final del procedimiento de experimentación el animal se puede mantener vivo o debe ser sacrificado de acuerdo con lo que establece el artículo 15 de la Ley 5/1995.

c) Si decide que el animal se puede mantener vivo, supervisar que reciba los cuidados adecuados a su estado de salud bajo control veterinario, que se mantenga en las condiciones establecidas en el artículo 5.1 de la Ley 5/1995 y que, en relación a las condiciones de alojamiento, se cumpla lo que dispone el artículo 12 de este Decreto.

d) En general, de todas las tareas de asesoramiento en materia de bienestar animal, con el fin de prevenir en todo momento el dolor, el sufrimiento, la angustia o daños durables a los animales.

CAPÍTULO 7

Identificación de los animales

Artículo 21

Identificación previa de los animales

A los perros, gatos y primates se les dotará, antes de su destete o separación de la madre, de una marca de identificación individual y permanentemente realizada de forma que se les cause el menor dolor posible.

Artículo 22

Identificación posterior

Cuando un perro, gato o primate se traslade de un centro de cría o suministrador antes de su destete o separación de la madre, y no haya podido ser identificado adecuadamente, el centro receptor exigirá los datos referentes a la identidad de la madre y procederá a su identificación lo más pronto posible.

CAPÍTULO 8

Comisión de experimentación animal

Artículo 23

Composición de la Comisión de experimentación animal

23.1 La Comisión de experimentación animal establecida en el artículo 20 de la Ley 5/1995 estará integrada por los siguientes miembros, nombrados por el consejero de Agricultura, Ganadería y Pesca por un período de cinco años renovables, a propuesta de las entidades o colectivos respectivos:

a) Un representante de los centros usuarios.

b) Un representante de las universidades, propuesto por el Consejo Interuniversitario de Cataluña.

c) Un representante del Departamento de Sanidad y Seguridad Social.

d) Un representante del Comisionado para universidades e investigación.

e) Un representante de la Dirección General del Medio Natural.

f) Un representante de la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias.

g) Un representante de las entidades de protección de los animales legalmente constituidas.

e) Un representante de las asociaciones profesionales especialistas en ciencias de los animales de laboratorio.

23.2 Actuará como presidente uno de los representantes del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, y como secretario el representante de la Dirección General del Medio Natural.

Artículo 24

Funciones de la Comisión de experimentación animal

24.1 Las funciones de la Comisión de experimentación animal son las siguientes:

a) Emitir informe vinculante en relación a las solicitudes de autorización de procedimientos.

b) Emitir informe sobre la solicitud de exención de la obligación de crear comités éticos de experimentación animal.

c) Actuar como órgano consultivo del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca en materia de experimentación animal.

d) Asesorar a los centros usuarios para el cumplimiento de la Ley 5/1995, especialmente sobre las técnicas que evitan procedimientos repetitivos o reiterativos y los métodos alternativos oficialmente validados.

24.2 Los informes citados en el apartado a) y b) anteriores, deben emitirse en el plazo de un

mes a contar desde la fecha de la petición respectiva.

Artículo 25

Funcionamiento de la Comisión de experimentación animal

25.1 La Comisión de experimentación animal se rige por las normas generales de funcionamiento siguientes:

a) La Comisión se reunirá como mínimo una vez al trimestre con carácter ordinario, y con carácter extraordinario en cualquier momento, con la convocatoria previa del presidente o a petición al menos de la mitad de sus componentes. En todo caso, la Comisión se podrá constituir cuando esté presente la totalidad de sus miembros y así lo acuerden por unanimidad.

b) La convocatoria se hará mediante carta enviada por correo, con especificación de la orden del día, al menos con cuatro días de antelación. En caso de necesidad, cuando así lo requiera la urgencia de la reunión, se utilizarán los medios necesarios para convocar a los vocales con 24 horas de antelación.

c) Para que la Comisión quede válidamente constituida será necesario que asista la mayoría de sus miembros.

d) Los acuerdos se tomarán por mayoría de votos. En caso de empate, decidirá el voto del presidente.

25.2 Subsidiariamente serán de aplicación las normas de funcionamiento de los órganos colegiados establecidos por la legislación de régimen jurídico de las administraciones públicas y del procedimiento administrativo común.

CAPÍTULO 9

Comités éticos de experimentación animal

Artículo 26

Creación de los comités éticos de experimentación animal

Los centros usuarios están obligados a crear comités éticos de experimentación animal, los cuales deben velar por el cuidado y el bienestar de los animales de experimentación.

Artículo 27

Composición de los comités éticos de experimentación animal

Los comités éticos de experimentación animal deben estar integrados por un mínimo de 3 personas con experiencia y conocimientos para velar por el bienestar y el cuidado de los animales, las instalaciones y los procedimientos de experimentación. Los miembros que, como mínimo, deben formar parte de estos comités, serán los siguientes:

a) El asesor en bienestar animal del centro.

b) Un representante de la unidad de garantía de calidad del centro, cuando exista, o en su defecto, un investigador del centro no directamente implicado en el procedimiento que deba informarse.

c) Una persona con experiencia y conocimientos en bienestar de los animales que no tenga relación directa con el centro o con el procedimiento de que se trate.

Artículo 28

Funciones de los comités éticos de experimentación animal

Las funciones de los comités éticos de experimentación animal son las siguientes:

a) Informar sobre la realización de los procedimientos de experimentación, previa evaluación de la idoneidad del procedimiento en relación con los objetivos del estudio, la posibilidad de alcanzar conclusiones válidas con el menor número posible de animales, la consideración de métodos alternativos a la utilización de los animales y la idoneidad de las especies seleccionadas.

b) Velar para que los animales no sufran innecesariamente y para que se les proporcione, cuando sea necesario, analgésicos, anestésicos u otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia.

c) Controlar que se utilicen métodos eutánicos humanitarios.

d) Velar para que el persona que participa en los procedimientos esté preparado para llevar a cabo las tareas encargadas.

e) Revisar procedimientos ya evaluados o suspender cualquier procedimiento ya iniciado que no se ajuste a los requisitos que establece el protocolo.

Artículo 29

Funcionamiento de los comités éticos de experimentación animal

Los comités éticos de experimentación animal deben regirse por las normas generales de funcionamiento siguientes:

a) Sus miembros respetarán el principio de confidencialidad.

b) La aprobación de la realización de los procedimientos de experimentación requerirá las mayorías siguientes:

Si el Comité está formado por 3 miembros, los acuerdos deberán tomarse por unanimidad.

Si el Comité está formado por más de 3 miembros, los acuerdos deberán tomarse por mayoría absoluta.

c) Cuando se considere oportuno, solicitarán el asesoramiento de personas expertas que no pertenezcan al Comité ético de experimentación animal, las cuales respetarán el principio de confidencialidad.

d) El investigador directamente implicado en el procedimiento o el personal colaborador en el procedimiento no podrán participar en la toma de decisiones sobre la aprobación de los procedimientos, aunque sean miembros del Comité ético de experimentación animal.

e) En el caso de procedimientos que no requieran autorización por parte del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca, los informes del Comité ético de experimentación animal serán vinculantes para el centro usuario.

Artículo 30

Exención de la creación de comités éticos de experimentación animal

30.1 El Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca podrá eximir de la creación de los comités éticos de experimentación animal en atención a la organización, capacidad y estructura de los centros que lo soliciten. A tal efecto, el centro usuario deberá presentar la solicitud correspondiente en la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias, acompañada de una memoria en la que se justifiquen las razones por las que solicitan la exención.

La Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias someterá a informe de la Comisión de experimentación animal la citada solicitud de exención.

30.2 Transcurrido el plazo de tres meses

desde la presentación de la solicitud sin que se haya dictado resolución expresa, la solicitud se entenderá desestimada.

30.3 La Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias puede revocar la Resolución de que se trate en atención a la modificación de los datos inscritos en el Registro a que se refiere el artículo 3.

Artículo 31

Control de los centros eximidos de la creación de comités éticos de experimentación animal

31.1 En los centros eximidos de la creación del Comité ético de experimentación animal el personal asesor en bienestar animal realizará las funciones establecidas en el artículo 28 de este Decreto.

31.2 El Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca establecerá un plan de controles para los centros eximidos de comités éticos de experimentación animal en función de cada tipo de centro y realizará inspecciones periódicas para comprobar el cumplimiento de lo que establece este Decreto.

CAPÍTULO 10

Control en la utilización de animales de experimentación

Artículo 32

Notificación de procedimientos

La utilización de animales de experimentación con las finalidades que se establecen en el artículo 2 de la Ley 5/1995, y que no requiere autorización para su realización, debe ser notificada previamente a la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca. La notificación del procedimiento tendrá una validez de dos años, siempre y cuando no exista ninguna modificación en el procedimiento. La validez de esta notificación se podrá prorrogar previa petición del centro usuario.

Artículo 33

Documentación a presentar para la notificación de procedimientos

Para la notificación del procedimiento de experimentación debe presentarse la siguiente documentación:

a) Memoria descriptiva del procedimiento, en la que se hará constar:

Los objetivos que se persiguen.

La metodología del procedimiento. En caso de que las líneas directivas de un procedimiento estén publicadas con carácter oficial o hayan sido oficialmente validadas, se considerará cumplimentado este extremo siempre que se aporte una copia de la publicación o validación correspondiente.

La especie y el número de animales que se utilizarán.

El tiempo aproximado de duración del procedimiento y frecuencia con que se realizará.

Destino final de los animales y, en caso de sacrificio, el método a utilizar.

La identificación del personal investigador responsable del procedimiento.

b) Informe del Comité ético de experimentación animal.

c) Los centros usuarios universitarios y los centros públicos de investigación deberán presentar, además, la relación de personal experimentador y de personal investigador implicados

en el procedimiento con especificación de su formación y titulación y, si procede, experiencia.

Artículo 34

Autorización de procedimientos

De acuerdo con lo que establece el artículo 17.2 de la Ley 5/1995, requiere autorización expresa del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca:

a) La utilización de animales de las especies incluidas en el anexo 1 de la Ley 5/1995, que no hayan nacido ni hayan sido expresamente criados en centros oficialmente reconocidos.

b) La utilización de animales salvajes capturados en la naturaleza y de animales protegidos o en peligro de extinción, si lo permite la normativa específica de protección, siempre que los objetivos del procedimiento sean la investigación que tienda a la protección de estas especies o a otros fines biomédicos esenciales y se compruebe que las citadas especies son excepcionalmente las únicas adecuadas para la finalidad que se pretende. Se excluyen las actividades científicas relacionadas con el anillado, el marcaje, y la toma de muestras para análisis rutinarios.

c) La ejecución de procedimientos de experimentación fuera de los centros usuarios.

d) La liberación de los animales durante el procedimiento de experimentación.

e) La realización de procedimientos en los que no se utiliza anestesia, analgesia u otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia, por ser incompatibles con los resultados perseguidos por el procedimiento o por estar contraindicada.

f) En aquellos procedimientos de experimentación en los que se han utilizado animales capturados en la naturaleza, la liberación al medio originario de estos animales.

g) La ejecución de procedimientos de experimentación en que el animal puede sufrir un dolor grave y prolongado.

h) La realización de procedimientos en el supuesto previsto en el artículo 37.2 de este Decreto.

i) La utilización en procedimientos de experimentación de animales que hayan sido sometidos previamente a otro procedimiento.

Artículo 35

Documentación a presentar para la autorización de procedimientos

Para la ejecución de los procedimientos de experimentación citados en el artículo anterior deberá presentarse una solicitud de autorización ante la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias, acompañada de la misma documentación que se solicita en el artículo 33 de este Decreto.

Artículo 36

Informe de la Comisión de experimentación animal

36.1 La Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias enviará a la Comisión de experimentación animal, la solicitud de autorización y el resto de documentación presentada. La Comisión de experimentación animal hará las comprobaciones y observaciones correspondientes, solicitará, si procede, información complementaria y emitirá el informe correspondiente, que tendrá carácter vinculante.

36.2 Transcurrido el plazo de dos meses desde la presentación de la solicitud sin que se

haya dictado resolución expresa, la solicitud se entenderá desestimada.

Artículo 37

Modificaciones de la memoria descriptiva de procedimientos autorizados

37.1 Cualquier modificación de la memoria descriptiva de un procedimiento previamente autorizado será notificada a la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias, junto con el informe del Comité ético de experimentación animal.

37.2 En caso de modificaciones relevantes será necesaria una nueva autorización de la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias para poder efectuar el procedimiento de experimentación, de acuerdo con lo que se establece en el artículo anterior.

37.3 Se consideran modificaciones relevantes aquellas que conlleven un aumento del número de animales a utilizar en el caso de especies protegidas o la utilización de una nueva especie protegida, un aumento de dolor o sufrimiento del animal, se efectúen en un lugar diferente del previsto inicialmente, o requiera la liberación del animal al medio natural.

Artículo 38

Información requerida a los centros usuarios

38.1 Los centros usuarios deben comunicar a la Dirección General de Producción e Industrias Agroalimentarias los procedimientos de experimentación realizados, el número de animales y las especies utilizadas en cada uno de ellos, en los plazos que para cada centro se fije en la resolución de inscripción en el Registro.

38.2 Estos plazos se fijarán en función de la estructura y organización del centro, del tipo de procedimiento que pretendan realizar y del número de animales que prevé utilizar el centro. En el caso que varíen estos parámetros, el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca puede modificar los plazos establecidos en la autorización.

CAPÍTULO 11

Régimen sancionador

Artículo 39

Normativa aplicable

El incumplimiento de lo que prevé este Decreto será sancionado de acuerdo con lo que establece la Ley 5/1995, sin perjuicio de la aplicación de otra normativa sectorial que pueda ser de aplicación.

DISPOSICIONES TRANSITORIAS

—1 Los centros de cría, suministradores y usuarios que en la fecha de publicación de este Decreto figuren inscritos en el Registro de núcleos zoológicos, deberán presentar, en el plazo de 3 meses a contar del día siguiente de su publicación, la documentación que se cita a continuación para poder ser inscritos en el Registro de centros de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación:

a) Impreso normalizado de la memoria justificativa del cumplimiento de los requisitos exigidos por este Decreto.

b) La relación del personal competente con especificación de su formación, titulación y experiencia, de acuerdo con lo que se establece en la disposición transitoria siguiente.

c) En el caso de que se trate de un centro usuario, la composición del Comité ético de experimentación animal.

d) Programa higiénico-sanitario.

—2 En relación a la calificación del personal de los centros que estén en funcionamiento en la fecha de publicación de este Decreto son de aplicación las normas siguientes:

a) La formación prevista en el artículo 18.1 para el personal para atender a los animales no se exigirá si se acredita disponer de experiencia en la cría y cuidado de los animales.

b) La formación prevista en el artículo 18.2 para el personal experimentador no se exigirá si el personal acredita una experiencia mínima de dos años en realización de procedimientos con animales de experimentación.

c) En relación al personal investigador y asesor en bienestar animal no se exigirá lo que prevén los apartados 3 y 4 del artículo 18 siempre que se acredite estar en posesión de una licenciatura y se disponga de una experiencia mínima de 2 años en el ejercicio de las tareas que según el citado artículo realiza este personal.

—3 Hasta la implantación de los ciclos formativos correspondientes a la nueva formación profesional que establece la LOGSE, para acceder a la categoría de personal experimentador deberá acreditarse la formación profesional de segundo grado o bachillerato unificado polivalente, así como la realización del curso homologado a que se refiere el anexo 2.

—4 Los expedientes de notificación y/o autorización de procedimientos que estén en tramitación en la fecha de entrada en vigor de este Decreto continuarán su tramitación de acuerdo con la normativa vigente en el momento de su presentación.

DISPOSICIÓN DEROGATORIA

Del artículo 3.2 de la Orden de 28 de noviembre de 1988, de creación del Registro de núcleos zoológicos de Cataluña (DOGC núm. 1087, de 30.12.1988) se suprime la referencia a los laboratorios y centros de experimentación con animales.

DISPOSICIÓN FINAL

Se faculta al Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca para dictar, en el ámbito de sus competencias, las disposiciones que sean necesarias para el desarrollo y la ejecución de este Decreto.

Barcelona, 30 de julio de 1997

JORDI PUJOL

Presidente de la Generalidad de Cataluña

FRANCESC XAVIER MARIMON I SABATÉ

Consejero de Agricultura, Ganadería y Pesca

ANEXO 1

Curso homologado para la formación del personal para atender a los animales

Duración mínima: 30 horas.

Materias:

Ética en experimentación animal.

Etología y bienestar de los animales de experimentación.

Instalaciones y equipos para el manejo de animales de experimentación:

Equipos básicos y específicos para el manejo de animales.

Materiales y productos.

Limpieza, desinfección y esterilización. Métodos y técnicas.

Manipulación y profilaxis de los animales de experimentación.

Marcaje e identificación animal.

Nutrición de los animales de experimentación.

Reproducción de los animales de experimentación.

Seguridad e higiene. Eliminación de residuos.

ANEXO 2

Curso homologado para la formación del personal experimentador

Duración mínima: 60 horas.

Materias:

Ética en experimentación animal.

Animales de experimentación:

Uso de los animales en procedimientos de experimentación.

Etología y bienestar de los animales de experimentación.

Control del bienestar de los animales de experimentación.

Legislación sobre el uso de los animales de experimentación.

Instalaciones y equipos para el manejo de animales de experimentación:

Animalarios.

Equipos básicos y específicos para el manejo de animales de experimentación.

Materiales y productos.

Desinfección y esterilización. Métodos y técnicas.

Transporte, recepción, marcaje e identificación animal:

Recepción: locales y salas de cuarentena.

Marcaje e identificación.

Nutrición de los animales de experimentación:

Necesidades y tipo de alimentación.

Necesidades nutricionales según el estado fisiológico de los animales.

Reproducción de los animales de experimentación:

Anatomía y fisiología del aparato reproductor de los animales de experimentación.

Gestación y partos.

Prácticas clínicas con animales de experimentación:

Reconocimiento de las patologías más frecuentes.

Toma de muestras biológicas.

Aplicación de medidas terapéuticas.

Eutanasia.

Eliminación de cadáveres.

Legislación sobre seguridad e higiene.

Legislación sobre eliminación de residuos.

ANEXO 3

Aspectos éticos y legales.

Biología y comportamiento de los animales de laboratorio.

Microbiología y enfermedades.

Diseño de los procedimientos de experimentación.

Anestesia, analgesia y eutanasia.

**DEPARTAMENTO
DE INDUSTRIA,
COMERCIO Y TURISMO**

Alternativas al uso de animales.
Análisis de la bibliografía científica mas relevante.
Zoología, fisiología animal y anatomía animal.

ANEXO 4

Aspectos éticos y legales.
Microbiología de las especies mas relevantes.
Patología, prevención y tratamiento de enfermedades.
Métodos de eutanasia y alivio del dolor.
Métodos alternativos al uso de animales.
Control de calidad y control sanitario.

(97.206.076)

RESOLUCIÓN

de 31 de julio de 1997, de delegación de competencias en materia de intervenciones de mercados de productos agroalimentarios.

Los artículos 38 y 39 de la Ley 13/1989, de 14 de diciembre, de organización, procedimiento y régimen jurídico de la Administración de la Generalidad de Cataluña, y el artículo 13 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de régimen jurídico de las administraciones públicas y del procedimiento administrativo común, prevén las condiciones y los requisitos para la delegación de competencias.

En virtud de esto.

RESUELVO:**Artículo 1**

1.1 Delegar en el jefe del Servicio de Regulación de Mercados Agroalimentarios las competencias que me corresponden en materia de intervenciones de mercados de productos agroalimentarios desde el día 1 al día 24 de agosto de 1997, ambos incluidos.

1.2 Delegar en el subdirector general de Comercialización e Industrias Agroalimentarias las competencias que me corresponden en materia de intervenciones de mercados de productos agroalimentarios desde el día 25 al día 31 de agosto de 1997, ambos incluidos.

Artículo 2

Los actos dictados por delegación se ajustarán al régimen que prevé el artículo 39 de la Ley 13/1989, de 24 de diciembre, de organización, procedimiento y régimen jurídico de la Administración de la Generalidad de Cataluña.

Barcelona, 31 de julio de 1997

GUSTAU GARCIA I GUILLAMET
Director general de Producción
e Industrias Agroalimentarias
(97.211.057)

*

RESOLUCIÓN

de 23 de julio de 1997, por la que se otorga a la empresa Gas Natural SDG, SA, la concesión administrativa para la conducción y el suministro de gas natural, gaseoducto Sils-Riudarenes-Santa Coloma de Farners.

La empresa Gas Natural SDG, SA, con domicilio social en Barcelona, av. Portal de L'Àngel, 20-22, que es titular de la concesión administrativa para la conducción de gas natural en el término municipal de Sils, otorgada por Resolución del consejero de Industria y Energía de fecha 18 de noviembre de 1993 (gaseoducto Caldes de Malavella-Palamós-Palafrugell), ha solicitado la concesión administrativa para llevar a cabo la conducción de gas natural desde Sils hasta Santa Coloma de Farners y efectuar el suministro doméstico, comercial e industrial en el término municipal de Santa Coloma de Farners.

Esta solicitud se ha formulado en relación con los acuerdos incluidos en la fase B del Plan de extensión de la red de gas natural en Cataluña.

De acuerdo con lo que prevé el artículo 10.2 del Decreto 2913/1973, de 26 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento general del servicio público de gases combustibles, Gas Natural SDG, SA, presentó el proyecto de las instalaciones correspondientes, en el que se describen las características básicas de la conducción principal:

Trazado: la conducción principal se inicia en el gaseoducto Caldes de Malavella-Palamós-Palafrugell, actualmente en servicio, en la salida de la estación de regulación y medida situada en el término municipal de Sils, cruza el término municipal de Riudarenes y llega a Santa Coloma de Farners, donde se efectuará el suministro doméstico, comercial e industrial.

Presupuesto total: 74.735.719 pesetas

La presentación del expediente de concesión ha sido notificada al Ayuntamiento de Santa Coloma de Farners, en aplicación de lo que establece el artículo 6 de la Ley 10/1987, de 15 de junio, de disposiciones básicas para un desarrollo coordinado de actuaciones en materia de combustibles gaseosos, para que se manifestara en cuanto a la facultad de reserva de prestación del servicio público de suministro de gas natural en este municipio, habiendo acordado la renuncia el Pleno del Ayuntamiento en sesión celebrada el día 13 de enero de 1997.

Asimismo, y en cumplimiento de lo que prevé el artículo 7 de la Ley 10/1987, de 15 de junio, y 11 del Reglamento general del servicio público de gases combustibles, el expediente de concesión administrativa ha sido sometido a un período de información pública mediante el Anuncio publicado en el DOGC núm. 2341, de 28.2.1997, en el BOE núm. 51, de 28.2.1997, y en los diarios *El Punt* y *Diari de Girona*, los dos de fecha 28 de febrero de 1997, sin que se hayan presentado alegaciones.

Paralelamente, de conformidad con lo que dispone el artículo 11 del Reglamento general del servicio público de gases combustibles, se pidieron informes sobre la solicitud formulada por la empresa suministradora al conjunto de organismos afectados: ayuntamientos de Sils, Riudarenes y Santa Coloma de Farners; Cámara de Comercio, Industria y Navegación de Girona; Cámara de la Propiedad Urbana de Girona;

Junta de Aguas; Delegación Territorial del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de Girona; Diputación y Servicio Territorial de Carreteras de Girona, algunos han informado favorablemente y otros han impuesto condiciones aceptadas por la peticionaria, que se deberán tener en cuenta en la fase de autorización administrativa de las instalaciones.

Una vez cumplidos los trámites administrativos que establecen el Decreto 2913/1973, de 26 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento general del servicio público de gases combustibles, que continúa en vigor según la disposición transitoria 1 de la Ley 10/1987, de 15 de junio, sobre disposiciones básicas para un desarrollo coordinado de actuaciones en materia de combustibles gaseosos; la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de régimen jurídico de las administraciones públicas y del procedimiento administrativo común; la Ley 13/1989, de 14 de diciembre, de organización, procedimiento y régimen jurídico de la Administración de la Generalidad de Cataluña y demás disposiciones de general aplicación:

Visto el informe favorable de la Delegación Territorial de Industria, Comercio y Turismo de Girona;

A propuesta de la Dirección General de Energía,

RESUELVO:

—1 Otorgar a la empresa Gas Natural SDG, SA, la concesión administrativa para la conducción de gas natural, Sils-Riudarenes-Santa Coloma de Farners.

—2 Otorgar a la empresa Gas Natural SDG, SA, la concesión administrativa para el suministro doméstico, comercial e industrial de gas natural, en el término municipal de Santa Coloma de Farners.

Esta concesión se ajusta a las condiciones generales que establecen la Ley 10/1987, de 15 de junio; el Decreto 2913/1973, de 26 de octubre; la Ley 13/1995, de 18 de mayo, de contratos de las administraciones públicas, y a las condiciones especiales siguientes:

—1 La empresa concesionaria constituirá en el plazo de dos meses, a contar desde la fecha de publicación de esta Resolución en el *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya*, una fianza por valor de 1.494.714 pesetas, el importe del 2% del presupuesto que figura en el proyecto técnico de las instalaciones presentado, para garantizar el cumplimiento de sus obligaciones, de acuerdo con el artículo 7.b) de la Ley 10/1987 y el artículo 13 del Reglamento general.

La fianza citada se depositará en la Caja General de Depósitos de la Generalidad de Cataluña, a disposición del director general de Energía, en valores del Estado, aval bancario o en metálico, según lo que dispone el artículo 11.3 del Decreto 1775/1967, de 22 de julio, sobre régimen de instalación, ampliación y traslado de industrias o mediante contrato de seguro concertado con entidades de seguros de las sometidas a la Ley 30/1995, de 11 de noviembre.

En el plazo de un mes desde la constitución de la fianza citada, la concesionaria deberá acreditar documentalmente, ante la Dirección General de Energía, el depósito efectuado.

Exp.: 1779/97

Construcció d'una planta de tractament de purins a la finca les Basses, de les Masies de Voltregà.

Exp.: 1412/97

Ampliació de l'edifici existent i millora de la torre de telecomunicacions situada al paratge cal Cases d'Aguilar, de Segarra.

Exp.: 1383/97

Ampliació de l'activitat Tèudis-01 d'extracció de graves naturals al paratge la Serreta, d'Artés.

Aprovar l'expedient sempre que s'asseguri l'adequada restauració dels terrenys amb els corresponents programes d'explotació i de restauració autoritzats pels organismes competents.

Exp.: 990/97

Construcció d'un nou centre reemissor a l'indret de cal Teixidor, de Sagàs.

Aprovar, de conformitat amb els articles 127 i 128 del text refós de la legislació vigent a Catalunya en matèria urbanística, i segons el procediment que assenyala l'article 44 del Reglament de gestió urbanística, amb les condicions que en el seu cas s'indiquen, i condicionant l'eficàcia de la concessió de la llicència per part de l'Ajuntament a la inscripció de la indivisibilitat de la finca al Registre de la propietat corresponent, els expedients de sol·licitud d'autorització d'obres en sòl no urbanitzable que es detallen a continuació:

Exp.: 1384/97

Instal·lació d'una trituradora de materials vegetals al paratge la Serreta, d'Artés.

Aprovar l'expedient amb la condició que es limiti l'activitat als terrenys qualificats de sòl d'interès agrícola, clau 11, i d'àrea extractiva, clau 14, d'acord amb el plànol adjunt.

D'altra banda, prèviament a la resolució de la llicència municipal s'han adoptat les mesures necessàries per restaurar la implantació d'arbrat i plantes arbustives al llarg de tota la superfície de talussos en els terminals sud i est de l'àmbit, així com també en la part de terreny qualificada de clau 12. També s'ha de plantar una filera d'arbres de fulla perenne al llarg del límit de la finca que afronta amb la carretera per tal de minorar l'impacte visual i paisatgístic.

Denegar, de conformitat amb els articles 127 i 128 del text refós de la legislació vigent a Catalunya en matèria urbanística i segons el procediment que assenyala l'article 44 del Reglament de gestió urbanística, els expedients de sol·licitud d'obres en sòl no urbanitzable que es detallen a continuació:

Exp.: 1759/97

Reforma i ampliació de l'habitatge anomenat can Teyà, de Sant Fost de Campsentelles.

Exp.: 1395/97

Construcció d'un habitatge a l'explotació ramadera Granja Puigjaner, de Folgueroles.

Exp.: 1390/97

Instal·lació fixa d'una planta de formigó preparat a la carretera d'Artés a Avinyó, km 1,8, d'Artés.

Exp.: 1438/97

Construcció d'una rampa-plataforma per a parapent a la zona del santuari de Queralt, de Berga.

Exp.: 1503/97

Ampliació del celler situat a la finca Molí Coloma del Rebato, de Subirats.

Contra els acords anteriors, que no exhaureixen la via administrativa, es pot interposar recurs ordinari davant el conseller de Política Territorial i Obres Públiques en el termini d'un mes a comptar de la data de publicació d'aquest Edicte. El recurs s'entendrà desestimat si passen tres mesos sense que hi hagi cap resolució expressa i quedarà aleshores oberta la via contenciosa administrativa.

Barcelona, 4 de novembre de 1997

BLANCA FELIU I BORRELL
Secretària de la Comissió d'Urbanisme
de Barcelona

(97.301.005)



DEPARTAMENT D'AGRICULTURA, RAMADERIA I PESCA

DECRET

286/1997, de 31 d'octubre, de modificació del Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

El Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques, va ser publicat en el *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya* núm. 2450, de 7.8.1997, període en el qual la majoria dels seus destinataris, entre ells les universitats i els laboratoris, no van poder realitzar les reunions prèvies necessàries per a la correcta difusió del seu contingut, atès que era un període de vacances.

L'esmentat Decret conté una sèrie de normes que creen obligacions noves a les quals han d'ajustar-se les persones que realitzen les activitats que s'hi regulen, i per tal de facilitar l'adaptació a la nova normativa es considera convenient modificar els aspectes que incideixen en la seva aplicació immediata.

Per això, a proposta del conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca i d'acord amb el Govern,

DECRETÒ:

Article 1

S'afegeix un nou apartat a l'article 15 del Decret 214/1997, de 30 de juliol, que queda redactat de la manera següent:

"15.3 El document a què fa referència l'apartat 15.2.b) serà exigible a partir de l'1 de gener de 1998."

Article 2

Es prorroga fins a l'1 de gener de 1998 el termini previst en la disposició transitòria 1 del Decret 214/1997, de 30 de juliol, perquè els centres de cria, subministradors i usuaris que figurin inscrits en el Registre de nuclis zoològics presentin la documentació que s'esmenta per tal de poder ser inscrits en el Registre de centres de cria, subministradors i usuaris d'animals d'experimentació.

Article 3

Es modifica la disposició transitòria 4 del Decret 214/1997, de 30 de juliol, la qual queda redactada de la manera següent:

"—4 Els expedients de notificació i/o autorització dels procediments que es realitzin durant l'any 1997 es tramitaran d'acord amb el Reial decret 223/1988, de 14 de març, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.

"Els procediments que es realitzin a partir de l'1 de gener de 1998 es notificaran i/o autoritzaran d'acord amb el que estableix aquest Decret."

Barcelona, 31 d'octubre de 1997

JORDI PUJOL
President de la Generalitat de Catalunya

FRANCESC XAVIER MARIMON I SABATÉ
Conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca
(97.294.048)

ORDRE

de 7 de novembre de 1997, de modificació de l'Ordre de 23 d'octubre de 1997, sobre mesures urgents per a la prevenció de la pesta porcina clàssica.

Mitjançant l'Ordre de 13 d'agost de 1997, de refosa i actualització de la normativa vigent sobre mesures urgents per a la prevenció de la pesta porcina clàssica (PPC), modificada per les ordres de 19 d'agost de 1997, de 2 d'octubre de 1997, de 20 d'octubre de 1997 i de 23 d'octubre de 1997, es declarava la presència de PPC en explotacions de municipis de Lleida i s'establien zones de protecció i vigilància al voltant dels focus i mesures específiques per tal d'evitar la difusió de la malaltia.

Davant l'aparició de quatre focus de pesta porcina clàssica en explotacions dels municipis d'Agramunt i Almenar, cal procedir a la seva declaració, així com a establir les zones de protecció i vigilància.

Basant-se en els reials decrets 2459/1996, de 2 de desembre, pel qual s'estableix la llista de malalties d'animals de declaració obligatòria i es dóna la normativa per a la seva notificació, i 2159/1993, de 13 de desembre, pel qual s'estableixen mesures relacionades amb la pesta porcina clàssica,

ORDENO:**Article 1**

Es declara la presència de quatre focus de pesta porcina clàssica en explotacions dels termes municipals d'Agramunt i Almenar (Lleida).

Article 2

2.1 S'estableixen zones de protecció que engloben els focus de la malaltia, amb un radi mínim de 3 quilòmetres, les quals es delimiten a l'annex 1 de la present disposició.

2.2 L'annex 1 de l'Ordre de 23 d'octubre de 1997, de modificació de l'Ordre de 20 d'octubre, sobre mesures urgents per a la prevenció de la pesta porcina clàssica, queda substituït per l'annex 1 de la present disposició.

Article 3

3.1 S'estableixen noves zones de vigilància que engloben els focus de la malaltia, amb un radi mínim de 10 quilòmetres, les quals es delimiten a l'annex 2 de la present disposició.

3.2 L'annex 2 de l'Ordre de 23 d'octubre de 1997, de modificació de l'Ordre de 20 d'octubre, sobre mesures urgents per a la prevenció de la pesta porcina clàssica, queda substituït per l'annex 2 de la present disposició.

Barcelona, 7 de novembre de 1997

FRANCESC XAVIER MARIMON I SABATÉ
Conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca

ANNEX 1**Zona de protecció A-1**

La zona de protecció A-1 comprèn:

De la comarca de la Noguera, el terme municipal sencer de la Sentiu de Sió, i part del terme municipal de Camarasa.

1. S'inicia a la intersecció dels termes municipals de Bellcaire d'Urgell, la Sentiu de Sió i Vallfogona de Balaguer.

2. Seguint el límit oest del terme municipal de la Sentiu de Sió, direcció nord, fins a la intersecció amb el límit sud del terme municipal de Camarasa.

3. Seguint el límit sud del terme municipal de Camarasa, en direcció est, fins a la intersecció amb la carretera C-147.

4. Seguint la carretera C-147, direcció nord-est, fins a Cal Tecletes.

5. Des de Cal Tecletes, s'estableix una línia recta, direcció est, fins a Cal Guasc.

6. Des de Cal Guasc, s'estableix una línia recta, direcció est, fins a Cal Pintabotes.

7. Des de Cal Pintabotes, s'estableix una línia recta, direcció est, fins a Cal Tomàs de l'Augusto.

8. Des de Cal Tomàs de l'Augusto, s'estableix una línia recta que, passant per Cal Monera i la Masia del Pere Pau, arriba fins a la intersecció amb la carretera C-1313.

9. Seguint la carretera C-1313, direcció sud-oest, fins a la intersecció amb el límit nord del terme municipal de la Sentiu de Sió.

10. Seguint el límit nord del terme municipal de la Sentiu de Sió, direcció est, després el límit est en direcció sud i el límit sud en direcció oest, fins a la intersecció amb el límit est del terme municipal de Vallfogona de Balaguer, que és el punt d'inici de la zona delimitada.

Zona de protecció A-2

La zona de protecció A-2 comprèn:

De la comarca de la Noguera, part dels termes municipals següents: Ponts, la Baronia de Rialb, Tiurana i Oliola.

1. S'inicia a la intersecció dels termes municipals de Ponts, Artesa de Segre i la Baronia de Rialb.

2. Des d'aquest punt, s'estableix una línia recta, direcció est, fins a la Serra de Rialb, al terme municipal de la Baronia de Rialb.

3. Des de la Serra de Rialb, s'estableix una línia recta, direcció est, fins a Masucó de la Cluella, al terme municipal de Tiurana.

4. Des de Masucó de la Cluella, s'estableix una línia recta, direcció sud-est, fins a Monistrol, al terme municipal d'Oliola.

5. Des de Monistrol, s'estableix una línia recta, direcció sud, fins a la intersecció de la carretera C-1313 amb el límit est del terme municipal de Ponts.

6. Seguint el límit est del terme municipal de Ponts, direcció sud, i després el seu límit sud, direcció oest, fins a la intersecció amb la carretera C-1313.

7. Des d'aquest punt, s'estableix una línia recta, direcció nord-oest, fins al Puig d'Estany, al terme municipal de Ponts.

8. Des del Puig d'Estany, s'estableix una línia recta, direcció nord, fins a Torreblanca.

9. Des de Torreblanca, s'estableix una línia recta, direcció nord, fins al punt d'intersecció dels termes municipals de Ponts, Artesa de Segre i la Baronia de Rialb, que és el punt d'inici de la zona delimitada.

Zona de protecció A-3

La zona de protecció A-3 comprèn:

De la comarca del Segrià, part dels termes municipals següents: Almenar, Alguaire i la Portella.

De la comarca de la Noguera, part dels termes municipals següents: Algerri i Albesa.

1. S'inicia a Pinyana. Des de Pinyana, s'estableix una línia recta, direcció nord-oest, fins a la Pleta de la Cuca.

2. Des de la Pleta de la Cuca, s'estableix una línia recta, direcció nord-oest, fins al Tossal del Vilarnau.

3. Des del Tossal del Vilarnau, establir una línia recta, direcció nord-est, fins a les Granges del Pla del Sas, al terme municipal d'Almenar.

4. Des de les Granges del Pla del Sas, establir una línia recta, direcció nord-est, fins a les Morrerres, al terme municipal d'Algerri.

5. Des de les Morrerres, establir una línia recta imaginària, direcció sud-est, que arribi fins a l'Eral, al terme municipal d'Albesa, aturant-se en el punt on aquesta línia es creua amb el límit nord del terme municipal d'Albesa.

6. Des d'aquest punt, establir una línia recta, direcció sud, fins a Lo Pont de la Dula, al terme municipal d'Albesa.

7. Des de Lo pont de la Dula, establir una línia recta, direcció sud-oest, fins a la Torre del Gatmullat, al terme municipal de la Portella.

8. Des de la Torre del Gatmullat, establir una línia recta, direcció sud-oest, fins a la Granja del Biel, al terme municipal d'Alguaire.

9. Des de la Granja del Biel, s'estableix una línia recta, direcció sud-oest, que, passant per la Torre del Sastre, arriba fins a Pinyana, que és el punt d'inici de la zona delimitada.

Zona de protecció A-4

La zona de protecció A-4 comprèn:

De la comarca de l'Urgell, part dels termes municipals següents: Agramunt, Puigverd d'Agramunt i Ossó de Sió.

1. S'inicia a Mafet, al terme municipal d'Agramunt.

2. Des de Mafet, s'estableix una línia recta, direcció est, fins al Mas l'Hostalric, al terme municipal d'Oliola.

3. Des de Mas l'Hostalric, s'estableix una línia recta, direcció sud-est, fins a les Puelles, al terme municipal d'Agramunt.

4. Des de les Puelles, s'estableix una línia recta, direcció sud-est, fins a Cal Vicenç Mas, al terme municipal de Puigverd d'Agramunt.

5. Des de Cal Vicenç Mas, s'estableix una línia recta, direcció sud, fins a la intersecció de la carretera L-303 amb el límit est del terme municipal de Puigverd d'Agramunt.

6. Des d'aquest punt, s'estableix una línia recta, direcció sud-oest, fins a Montfalcó d'Ossó, al terme municipal d'Ossó de Sió.

7. Des de Montfalcó d'Ossó, s'estableix una línia recta, direcció sud-oest, fins a la intersecció de la carretera C-240 amb el límit est del terme municipal de Puigverd d'Agramunt.

8. Des d'aquest punt, s'estableix una línia recta, direcció nord-oest, fins al Mas de Muntada, al terme municipal d'Agramunt.

9. Des de Mas de Muntada, s'estableix una línia recta, direcció nord-oest, fins a Ca l'Isidori.

10. Des de Ca l'Isidori, s'estableix una línia recta, direcció nord, fins al Molí del Segarrenc.

11. Des del Molí del Segarrenc, s'estableix una línia recta, direcció nord-est, fins a Cal Martorell.

12. Des de Cal Martorell, s'estableix una línia recta, direcció nord, fins a Mafet, que és el punt d'inici de la zona delimitada.

DEPARTAMENT D'AGRICULTURA, RAMADERIA I PESCA

DECRET

164/1998, de 8 de juliol, de modificació del Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i altres finalitats científiques.

Per tal d'adequar certs aspectes del Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i altres finalitats científiques (DOGC núm. 2450, de 7.8.1997), als ensenyaments que es cursen en l'actualitat, cal introduir-hi algunes modificacions.

Per això, a proposta del conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca i d'acord amb el Govern,

DECRETO:

Article 1

Es modifica l'article 18 del Decret 214/1997, de 30 de juliol, d'acord amb el que s'especifica a continuació:

A l'apartat 2.b), a continuació de "família professional química" s'afegeix "i de la família professional sanitària".

S'hi afegeix un apartat 5, el qual queda redactat de la manera següent:

"18.5 El Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca validarà els cursos per a la formació del personal que es realitzin fora de l'àmbit de Catalunya, sempre que s'acrediti la seva adequació a les matèries establertes en els annexos d'aquest Decret."

Article 2

Es modifica l'annex 3 del Decret 214/1997, de 30 de juliol, de la manera següent:

Se suprimeix: "Zoologia, fisiologia animal i anatomia animal".

S'afegeix: "Durada mínima: 80 hores".

Barcelona, 8 de juliol de 1998

JORDI PUJOL

President de la Generalitat de Catalunya

FRANCESC XAVIER MARIMON I SABATÉ

Conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca

(98.183.043)

DECRET

165/1998, de 8 de juliol, sobre àrees de caça amb reglamentació especial.

Els articles 23.1 de la Llei de caça i 25.2 del seu Reglament preveuen la possibilitat d'establir reglamentacions especials per a les àrees de caça que ho sol·licitin.

La situació actual de la caça a Catalunya, on la pràctica totalitat del territori és subjecte a regulació cinegètica, fa necessari adaptar la figura de l'àrea de caça amb reglamentació específica a la realitat actual. Aquest tipus de zones han proliferat i donen sortida per una banda a un nombre important de caçadors que no tenen un lloc habitual de caça i, per una altra, permeten la caça en zones concretes fora del període hàbil. Si bé aquest últim era el seu esperit inicial, a la pràctica han esdevingut zones de caça inten-

siva, la qual cosa fa que calgui ordenar aquesta activitat.

D'acord amb la Llei 1/1970, de 4 d'abril, de caça, i el Decret 506/1971, de 25 de març, pel qual s'aprova el Reglament de caça, i l'Ordre de 7 de juny de 1995, de regulació de les explotacions ramaderes que allotgin espècies cinegètiques;

D'acord amb el dictamen de la Comissió Jurídica Assessora;

A proposta del conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca i d'acord amb el Govern,

DECRETO:

Article 1

Concepte

1.1 Es considera àrea privada de caça amb reglamentació especial aquella en la qual es permet l'alliberament d'individus procedents de granges cinegètiques de les espècies que s'indiquen a l'annex d'aquest Decret, amb la finalitat de capturar-les d'una forma intensiva.

1.2 Tota àrea privada de caça amb reglamentació especial ha de disposar del següent:

a) Una zona de caça intensiva, que és l'única part en la qual es permet l'alliberament i la captura d'exemplars d'espècies de caça indicats a l'annex d'aquest Decret, durant el temps de veda.

b) Una zona de refugi en la qual no es permet cap aprofitament cinegètic.

c) Una zona que inclou la resta de la superfície de l'àrea de caça que és susceptible d'aprofitament cinegètic d'acord amb el règim general establert per a les àrees privades de caça.

Article 2

Condicions

Només podran optar a l'autorització d'una reglamentació especial les àrees privades de caça que compleixin les condicions següents:

a) El titular ha de ser una persona física o jurídica que tingui una activitat econòmica.

b) La superfície mínima de l'àrea privada de caça ha de ser de 250 ha.

c) No poden estar mai situades, ni totalment ni parcial, en espais naturals de protecció especial (parcs naturals, paratges naturals d'interès nacional, reserves naturals, reserves naturals de fauna salvatge, o les seves zones perifèriques, incloses les dels parcs nacionals), ni en espais inclosos en el PEIN.

d) L'àrea de caça ha de disposar de guàrdia suficient per tal de garantir la seva vigilància, la qual cosa s'ha d'especificar clarament en el pla tècnic de gestió.

e) Un mínim del 30% del total de la superfície de l'àrea privada de caça es destinarà a zona de refugi, degudament senyalitzada, on no es realitzarà cap aprofitament cinegètic ni caça intensiva. Aquesta superfície ha de ser contínua i fixa (no modificable respecte a la zona delimitada a l'autorització).

f) En les àrees privades de caça amb reglamentació especial per a caça menor, la zona de caça intensiva tindrà un mínim de 175 ha i un màxim de 300 ha.

g) La zona de caça intensiva estarà senyalitzada de tal manera que qualsevol persona s'adoni perfectament que hi entra. Tot el perímetre haurà d'estar correctament senyalitzat amb els

rètols que estipula la Resolució de 28 de novembre de 1983.

h) Per a les espècies d'aprofitament intensiu incloses a l'annex, i només a la zona intensiva, el període hàbil de caça serà el fixat al pla tècnic de gestió cinegètica.

Article 3

Sol·licituds

Les sol·licituds es presentaran als serveis territorials o a les oficines comarcals del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca corresponent, acompanyades d'un pla tècnic de gestió cinegètica, d'acord amb la normativa vigent.

Article 4

Autoritzacions

La condició d'àrea privada de caça amb reglamentació especial serà atorgada mitjançant resolució del director general del Medi Natural previ informe favorable del consell territorial de caça corresponent, sempre que es compleixin tots els requisits inclosos en aquesta disposició. Contra la denegació es podrà interposar recurs ordinari davant el conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca.

Article 5

Espècies caçables i períodes hàbils

5.1 La caça de les espècies cinegètiques no incloses a l'annex d'aquest Decret només podrà realitzar-se durant el període hàbil de caça de l'espècie a Catalunya, però mai a l'interior de la zona de refugi.

5.2 La caça de les espècies incloses a l'annex d'aquest Decret ha d'ajustar-se a les condicions següents:

a) Espècies classificades com a autòctones: se n'autoritza la captura durant el període hàbil en el conjunt de l'àrea privada de caça, amb excepció de la zona de refugi, i fora del període hàbil en la zona de caça intensiva, amb excepció del període de reproducció de la perdiu roja i de la guatlla, que s'indica també a l'annex.

b) Espècies classificades com a exòtiques: se n'autoritza la captura en la zona intensiva durant tot l'any, en funció del període hàbil que estableixi el pla tècnic de gestió cinegètica.

5.3 Els individus de les espècies de caça que s'alliberin per a l'exercici de la caça intensiva han de complir els requisits següents:

a) Només podran procedir de granges ubicades a Catalunya que estiguin inscrites en el Registre d'explotacions ramaderes o de granges de fora de Catalunya que compleixin la legislació indicada a l'apartat 5.3.c) i que, en el cas d'existir, figurin en els registres oficials de la comunitat autònoma o país d'origen.

b) Resta totalment prohibida la utilització d'híbrids, de les espècies indicades a l'annex, entre si o amb d'altres.

c) En tot moment han de complir l'Ordre de 7 de juny de 1995, de regulació de les explotacions ramaderes que allotgin espècies cinegètiques, en el qual també s'especifica la normativa de repoblació.

d) D'acord amb la legislació vigent, caldrà una autorització prèvia de la Secció de Conservació de la Natura corresponent per realitzar els alliberaments dels animals. En el cas concret de les zones de caça intensiva, aquestes autoritzacions podran ser per a tota la temporada, sem-

pre que es tracti d'exemplars procedents d'una mateixa explotació cinegètica.

5.4 S'autoritzen les modalitats de caça permeses a l'Ordre anual per la qual es fixen els períodes hàbils de caça a tot el territori de Catalunya i les vedes especials que s'estableixen per a cada temporada.

Article 6 Senyalització

La senyalització de les àrees privades de caça amb reglamentació especial es realitzarà segons el que s'estableix a continuació, d'acord amb les resolucions de 25 de gener de 1983 (DOGC núm. 306, de 23.2.1983), de 28 de novembre de 1983 (DOGC núm. 396, de 4.1.1984) i de 31 de gener de 1986 (DOGC núm. 672, de 14.4.1986):

a) Perifèria de l'àrea privada de caça: cartells C-01 i C-31.

b) Zona de refugi: cartells C-32.

c) Zona de caça intensiva:

En camins, pistes, carreteres o a menys de 200 m d'una edificació, amb el cartell C-12.

Resta de la zona de caça intensiva, amb el cartell C-33.

Article 7

L'incompliment del que s'estableix en aquesta disposició serà sancionat d'acord amb el que preveuen la Llei de caça, de 4 d'abril de 1970, el Decret 506/1971, de 25 de març, pel qual s'aprova el Reglament de caça, la Llei 3/1988, de 4 de març, de protecció dels animals, i altres disposicions concordants.

DISPOSICIÓ DEROGATÒRIA

Es deroga la Resolució de 30 de juliol de 1992, per la qual es regulen les reglamentacions específiques de caça (DOGC núm. 1629, de 7.8.1992).

DISPOSICIONS TRANSITÒRIES

Primera

Les àrees privades de caça amb reglamentació específica que estiguin autoritzades en el moment de la publicació d'aquest Decret podran continuar desenvolupant la seva activitat durant aquesta temporada de caça 1997-98 d'acord amb l'autorització de què disposin. A partir de la temporada de caça 1998-99 els serà d'aplicació la normativa establerta en aquest Decret.

Segona

Aquelles àrees que en el moment de la publicació d'aquest Decret es trobin en l'interior dels espais esmentats a l'article 2.c) poden continuar la seva activitat sempre que compleixin la resta de requisits previstos en aquest Decret i fins que caduquin les autoritzacions respectives.

Barcelona, 8 de juliol de 1998.

JORDI PUJOL

President de la Generalitat de Catalunya

FRANCESC XAVIER MARIMON I SABATÉ

Conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca

ANNEX

Espècies i períodes autoritzats a les zones de caça intensiva de les àrees privades de caça amb reglamentació especial

Autòctones

Espècie: perdiu roja.

Nom científic: *Alectoris rufa*.

Període en què es prohibeix la caça intensiva (1): 15 d'abril-30 de maig.

Origen autoritzat (2): Espanya.

Espècie: faisà.

Nom científic: *Phasianus colchicus*.

Espècie: conill.

Nom científic: *Oryctolagus cuniculus*.

Origen autoritzat (2): Espanya.

Espècie: llebre.

Nom científic: *Lepus europaeus*.

Origen autoritzat (2): Espanya.

Espècie: colom roquer.

Nom científic: *Columba livia*.

Origen autoritzat (2): Espanya.

Espècie: guatlla.

Nom científic: *Coturnix coturnix*.

Període en el que es prohibeix la caça intensiva (1): 1 de juny-30 de setembre.

Origen autoritzat (2): Espanya.

Exòtiques

Espècie: colí de Califòrnia.

Nom científic: *Lophortyx californica*.

Espècie: colí de Virgínia.

Nom científic: *Colinus virginianus*.

Espècie: guatlla japonesa.

Nom científic: *Coturnix japonica*.

(1) Període reproductor.

(2) Per salvaguardar les subespècies autòctones.
(98.183.042)

DECRET

166/1998, de 8 de juliol, de regulació de l'accés motoritzat al medi natural.

És objecte d'aquest Decret la configuració de la normativa reglamentària de l'accés motoritzat al medi natural i el desplegament normatiu de la Llei 9/1995, de 27 de juliol, de regulació de l'accés motoritzat al medi natural.

Durant el període de vigència de l'esmentada Llei s'ha pogut constatar una notable disminució dels impactes produïts per la circulació motoritzada en els espais naturals i els terrenys forestals definits per la Llei 12/1985, de 13 de juny, i la Llei 6/1988, de 30 de març, respectivament, que també afecten negativament els drets i la qualitat de vida de la població rural.

Alhora, l'experiència adquirida en els dos anys transcorreguts des de la seva promulgació permet desenvolupar amb més precisió algun dels seus preceptes i, en general, desplegar el seu contingut.

De la mateixa forma que la Llei a la qual desenvolupa, aquest Decret s'estructura en quatre capítols dedicats, respectivament, a les disposicions generals, la circulació de vehicles, les competicions esportives i la disciplina.

Del capítol 1 cal destacar, pel que fa a l'àmbit territorial d'aplicació de la norma, la definició dels diferents tipus de vial objecte del Decret.

En relació a les normes relatives a la circulació de vehicles el capítol 2 del Decret desplega el

que preveu la Llei sobre la base del desenvolupament del precepte relatiu a la delimitació dels vials en els quals s'autoritza la circulació motoritzada. En aquest mateix capítol s'especifica el procediment d'elaboració, aprovació i actualització de l'inventari de camins rurals i dels camins i pistes forestals, s'estableix el règim d'obertura de nous vials en terrenys forestals, es determina la composició i funcions de la Comissió Consultiva Comarcal, es regulen les anomenades àrees de circulació per al lleure i l'esport, els itineraris per a la pràctica de motociclisme de muntanya i els circuits permanents no tancats, així com les normes específiques per a la circulació motoritzada en grup.

Al capítol 3, referent a les competicions esportives, es defineixen les diferents modalitats de competicions, s'estableix el procediment d'elaboració i aprovació del Catàleg i el calendari de proves, el règim de les autoritzacions, garanties, suspensió de les competicions, retirada de material i reparació del terreny i publicitat.

El capítol 4, sobre la disciplina, conté 4 seccions relatives, respectivament, a la tipificació de les infraccions, el procediment, les sancions i, finalment, als agents de l'autoritat i mesures cautelars.

Vist que la Comissió de Govern Local de Catalunya ha informat favorablement el projecte en data 18 de desembre de 1997.

Vist el dictamen de la Comissió Jurídica Assessora de 14 de maig de 1998.

A proposta del conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca i d'acord amb el Govern,

DECRETO:

CAPÍTOL 1

Disposicions generals

Article 1

Objecte

És objecte d'aquest Decret la regulació de l'accés motoritzat al medi natural i el desplegament normatiu de la Llei 9/1995, de 27 de juliol.

Article 2

Àmbit territorial d'aplicació

2.1 L'àmbit territorial d'aplicació d'aquest Decret és constituït per:

a) Els espais naturals definits per la Llei 12/1985, de 13 de juny, d'espais naturals.

b) Els terrenys forestals definits per la Llei 6/1988, de 30 de març, forestal de Catalunya.

c) El conjunt de camins rurals, camins i pistes forestals, camins de bast i ramaders, senders i corriols.

d) Els llits de les corrents naturals d'aigua, contínues o discontinúes i els dels llacs, llacunes i embassaments superficials en lleres públiques.

2.2 A efectes d'aquest Decret s'entén per:

a) Camins forestals, les vies de terra o pavimentades de circulació permanent que serveixen per a la gestió, la vigilància i la defensa de les forests, amb una amplada mitjana de plataforma de 4 metres, que formen la xarxa forestal bàsica.

b) Pistes forestals, les vies de terra o pavimentades connectades amb les anteriors, i de característiques similars, construïdes primordialment

Induction of alloxan/streptozotocin diabetes in dogs: A revised experimental technique

H. R. ANDERSON¹, A. W. STITT¹, T. A. GARDINER¹, S. J. LLOYD² & D. B. ARCHER¹

¹Department of Ophthalmology, The Queen's University of Belfast, ²Medical Research Unit, The Queen's University of Belfast, Belfast BT12 6BA, UK

Summary

The diabetic dog represents an excellent model for use in many aspects of diabetic research. The present paper describes, in detail, a reproducible experimental protocol for the successful induction of chemical diabetes in beagles using a combination of the 2 pancreatic beta-cell cytotoxic agents alloxan and streptozotocin.

Keywords: Dogs; Diabetes mellitus; Alloxan; Streptozotocin

The diabetic dog represents an excellent model for the study of diabetic retinopathy as it reproduces all but the very late changes observed in the human diabetic eye (Engerman *et al.*, 1977; Black *et al.*, 1980; Engerman *et al.*, 1982).

In the majority of previous studies the techniques employed to induce chemical diabetes in dogs have involved the use of one of the 2 pancreatic beta-cell cytotoxic agents alloxan and streptozotocin (Engerman *et al.*, 1977; Engerman & Bloodworth, 1965; Rakieta *et al.*, 1963). However, a major drawback of these methods was a high mortality of animals. When administered singly, the diabetogenic doses of alloxan and streptozotocin required had adverse effects on other organ systems. Also, many animals were lost through a severe hypoglycaemic episode caused by insulin dumping from injured beta-cells in the acute period (during the first 24 h).

The combination of alloxan and streptozotocin to induce diabetes has the advantage of allowing the use of lower doses of both drugs than if either was used singly (Issekutz *et al.*, 1974). High doses of alloxan and streptozotocin can have toxic effects on other organ systems causing severe liver and kidney damage including necrosis and fatty infiltration (Rerup, 1970). However, a detailed study of the biochemical and morphological changes which occur following administration of the drug combination has shown no evidence of any significant toxicity to organs other than the pancreas (Black *et al.*, 1980).

The present paper proposes a detailed experimental regimen, outlining further refinements to previous techniques in the induction of alloxan/streptozotocin diabetes in dogs without severe hypoglycaemia or mortality.

Materials and methods

The study involved adult laboratory bred beagles which were obtained from a commercial supplier and housed in conventional laboratory conditions in accordance with the Home Office Code of Practice (Home Office, 1989). The dogs were divided into 2 groups; Group I. Twenty beagle dogs aged between 4.5 and 5 months and weighing 11–17 kg.

Group II. Four beagle dogs aged between 14 and 17 months and weighing 19–24 kg.

All dogs used in the study were housed in individual kennels and fed twice daily (morning and evening) on a diet of tripe and biscuit fortified with vitamins and minerals.

On the morning of induction of diabetes all dogs were fed once and then fasted for the rest of the day.

Correspondence to: Dr HR Anderson.

Received 23 October 1992; accepted 20 January 1993

The same evening (12–14 h after feeding) the dogs were each given a single intravenous (IV) injection of an alloxan (40 mg/kg)/streptozotocin (35 mg/kg) mixture via the cephalic vein in the foreleg. Both drugs were initially prepared aseptically as solutions containing 100 mg/ml in trisodium citrate buffer, pH 4.5 and sterilized by filtration through 0.22 μ m filters. The drug solutions were prepared immediately before administration as the compounds display chemical instability in solution.

Approximately 8 h after drug treatment each dog was placed in a Pavlov sling and administered 0.9% NaCl saline containing 5% dextrose through an intravenous drip into either the cephalic vein in the foreleg or the saphenous vein in the hind leg. The dogs were maintained on dextrose saline for a further 8–9 h in order to prevent any hypoglycaemic episodes. Throughout, the dogs were kept under constant supervision and blood glucose levels were measured hourly with an Ames glucometer reflectance photometer. The flow rate of the saline/dextrose drip was adjusted accordingly to ensure that blood glucose levels did not fall below 5 mM/l. The dogs were then taken off the drips (approximately 16 h post drug administration), returned to their kennels and fed.

The next morning (approximately 34 h post drug administration), blood glucose was measured and each dog given 2 units of insulin by subcutaneous injection. Blood glucose levels were measured several times throughout the course of the day and each dog was given a further injection of insulin later in the day according to the blood glucose level.

Every day thereafter, blood glucose levels were measured first thing in the morning before feeding and the dose of insulin altered to maintain a blood glucose level of between 15 and 23 mM/l.

Results

Dogs in both groups showed a similar initial response over the first 16 h after alloxan/streptozotocin treatment. At 9 h post drug administration blood glucose levels had fallen

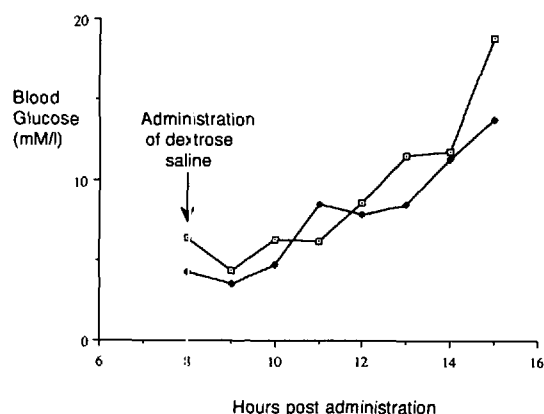


Fig. 1. Mean blood glucose levels of dogs in groups I and II from 8–16 h post administration of alloxan/streptozotocin. —□— group I —◆— group II.

from normal (5 mM/l) to between 3 and 4 mM/l. At this time all dogs were given an intravenous drip of 0.9% NaCl containing 5% dextrose. From this point onwards the exogenous supply of sugar in the intravenous drips caused an artificial increase in circulating blood glucose levels and thus prevented any potentially dangerous hypoglycaemic episodes (Fig. 1).

Over the following 7–8 h all dogs received between 2000 ml and 2500 ml of 5% dextrose saline. Throughout this period blood glucose was measured at half-hourly intervals and the dextrose drip adjusted accordingly. In a pilot study in which alloxan/streptozotocin diabetes was induced in 10 dogs it was observed that when the IV dextrose was replaced with Hartmans solution the dogs blood sugar fell precipitously. By periodically substituting the IV dextrose with Hartmans and measuring the animals' blood glucose within 20 min it was determined that dextrose infusion was required up to 16 h post induction. After this time the animals' blood glucose remained within or above normal limits when the dextrose was withdrawn and the infusion could be discontinued. Thus in the present experiment all dogs were taken off their drips after 16 h and they slowly became hyperglycaemic so that on the second day after drug administration the average blood glucose of the dogs in group I had risen to a high level

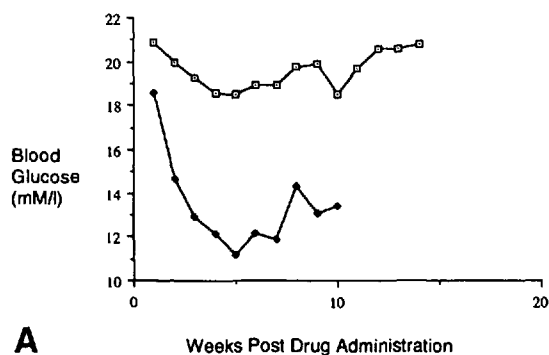


Fig. 2a. Graph showing mean glucose levels of dogs in groups I and II from 1–16 weeks post administration of alloxan/streptozotocin. —□— group I —◆— group II.

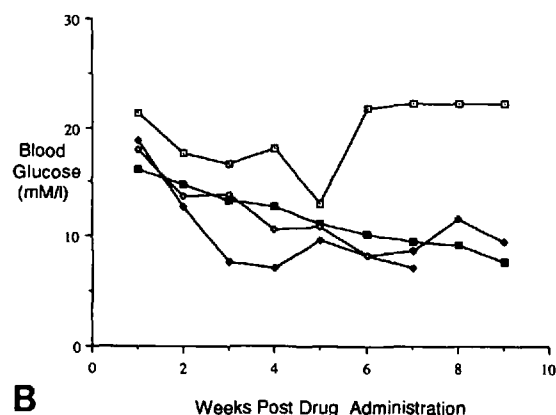


Fig. 2b. Graph showing blood glucose levels of each dog in group II from 1–9 weeks post drug administration of alloxan/streptozotocin. —□— dog 1 —◆— dog 2 —■— dog 3 —◇— dog 4.

(<22.2 mM/l) and in group II the average blood glucose level was 20 mM/l.

All group I dogs were successfully maintained at a blood glucose level of around 20 mM/l for a period of 16 weeks requiring between 17 and 49 units of insulin per day (Fig. 2a). These dogs all remained healthy, retained a normal appetite and gained weight.

Fig. 2a shows that the average blood glucose level of the 4 dogs in group II decreased over the first 5 weeks to around 11 mM/l and then increased slightly to 13 mM/l after 10 weeks. However, examination of the individual weekly blood glucose levels of each dog in group II

shows that the reaction of each dog to the alloxan/streptozotocin treatment was variable (Fig. 2b). Dogs 2, 3 and 4 showed a gradual decline in blood glucose levels over a 9-week period and they stopped requiring exogenous insulin between 4 and 5 weeks. However, dog 1 showed an initial overall decline in blood glucose to about 15 mM/l and required only 6–7 units of insulin per day after 5 weeks. Its blood glucose level then increased so that from 6 weeks onwards the blood glucose level was high (<22.2 mM/l) and its insulin requirements increased from 7 to 26 units per day. All 4 dogs remained difficult to feed and lost weight over the 9-week period of study. Dogs 2, 3 and 4 showed severe weight loss, and eventually all 3 were culled between 7 and 9 weeks post drug administration.

Discussion

Results show that dogs in both groups I and II reacted similarly over the first 16 h following the administration of an alloxan/streptozotocin cocktail. The marked decrease in blood glucose observed 8 to 9 h after drug treatment had been anticipated, such a phenomena having been described in previous studies which attributed it to a release of insulin from the damaged pancreatic beta cells (Black *et al.*, 1980). Therefore, in order to prevent the occurrence of severe, life-threatening hypoglycaemia, in the present study, dogs were given an intravenous drip of 0.9% NaCl saline containing 5% dextrose. This allowed the animals' blood glucose to be maintained at or above normal limits and no dogs were lost through hypoglycaemia during the induction period of the study. The success of this measure in preventing fatality is particularly significant since severe hypoglycaemia shortly after drug administration has previously represented one of the major problems with survival following chemically induced diabetes in experimental animals. The importance of the continuous drip was shown in the case of one dog whose blood glucose level fell to 1.7 mM/l after receiving saline solution only with no added dextrose over a 2 h period. All dogs were taken off the drips at 16 h post

drug administration by which time all the insulin released by the damaged beta cells had been metabolized and the dogs' own blood sugar had begun to increase.

The use of an intravenous drip allows an immediate and continual supply of glucose into the blood stream and resulted in an increase in blood sugar after only 1 h. This method represents a significant improvement over that used by Black *et al.* (1980) in which 4 subcutaneous injections of glucose (50–100 ml, 10% dextrose) were administered at 8, 11, 13 and 16 h post-drug treatment. Large subcutaneous injections of 10% dextrose may be highly irritant and the study by Black *et al.* (1980) failed to prevent hypoglycaemia, the blood sugar remaining low for between 7 and 12 h.

Results from the present study showed a difference in the way in which dogs of different ages/weights reacted to the induction of diabetes by alloxan/streptozotocin. Thus, all dogs in the weight range 11–17 kg responded well to drug treatment and showed a 100% survival rate while all the older/heavier dogs in the study (19–24 kg, 14–17 months) were difficult to maintain as diabetics, lost weight and ultimately became ill. This suggests that there is an optimum age/weight of dogs which should be used in diabetic studies of this nature (between 11 and 17 kg, i.e. 4.5–5 months of age). The ages and weights of dogs used in previous diabetic studies have varied considerably, for example 6–11 kg (Rakieten *et al.*, 1963), 8–13 kg (Black *et al.*, 1980), 18–30 months (Kern & Engerman, 1988) and dogs have even been used when their ages were only an estimate and ranged from 3–13 years (Engerman *et al.*, 1977).

The results from a number of these studies are difficult to assess as the dogs were of different ages and breeds while those in the present study were healthy young beagles of the same sex and from the same colony. As current legislation in Great Britain restricts the supply of animals for medical research to those from reputable commercial establishments and other registered breeding units it should not be difficult for researchers undertaking future diabetic studies

in the dog to cost for and obtain animals of the optimal age/weight and sex.

Induction of diabetes by a combination of alloxan and streptozotocin allows the use of drug levels considerably below the diabetogenic dose, if either drug was used independently. Previous studies employing this cocktail combination to induce diabetes used doses of 50 mg/kg alloxan and 30 mg/kg streptozotocin (Black *et al.*, 1980; Isselkutz *et al.*, 1974). Alloxan, if used in such large doses is known to have toxic effects on other organ systems causing severe liver and kidney damage (Rerup, 1970). Since drugs were administered on a weight basis, it is likely that the ill health and poor survival of the heavier dogs in the present study was caused by toxic effects of the large doses of alloxan which they received. At autopsy dogs 2, 3 and 4 showed severe hepatic necrosis with extensive fatty infiltration, a condition previously described in dogs after administration of high doses of alloxan (Rerup, 1970). Administration of alloxan and streptozotocin on a body-surface basis rather than on a weight basis would have resulted in the heavier dogs receiving proportionately smaller doses of the 2 drugs. However, while these lower drug doses may have reduced the toxic effects they are unlikely to have induced diabetes as 3 of the 4 dogs in group II did not become diabetic after administration of the higher drug doses.

Other technical modifications employed in the present investigation include the use of dogs all of the same sex (male) and the same breed (beagle). In previous studies, dogs of both sexes were often used (Rakieten *et al.*, 1963; Kern & Engerman, 1988; Kern & Engerman, 1990), and in some, the dogs were also of different breeds (Engerman *et al.*, 1977).

In the present study the dogs were fasted for 12 to 14 h before administration of the drug cocktail. Animals treated with streptozotocin/alloxan often showed initial adverse reactions to the drugs, e.g. nausea, vomiting etc. A shorter fasting period ought to help the dog withstand the rigours of these post-treatment side-effects than if they had been fasted for 24 h as in previous studies (Black *et al.*, 1980; Kern & Engerman, 1990).

The present paper presents a reproducible technique for the successful induction of chemical diabetes in dogs. The dog represents an excellent animal model for use in diabetic studies. The animals are easily handled and are known to produce retinal and kidney lesions morphologically identical to those of humans (Engerman *et al.*, 1977; Black *et al.*, 1980; Engerman *et al.*, 1982; Kern & Engerman, 1988; Rerup, 1970;

Kern & Engerman, 1987). As the vascular sequelae of diabetes are multifactorial in their aetiology requiring input from complex communities of different cell types it is certain that cell culture technology will not replace animal models in the foreseeable future. Therefore, the protocol outlined in the present paper should help reduce stress and fatality in sensitive and increasingly valuable animals.

References

- Black HE, Rosenblum IY & Capen CC (1980) Chemically induced (streptozotocin-alloxan) diabetes mellitus in the dog. *American Journal of Pathology* **98**, 295–305
- Engerman RL & Bloodworth JMB (1965) Experimental diabetic retinopathy in dogs. *Archives of Ophthalmology* **73**, 205–210
- Engerman RL, Bloodworth JMB & Nelson BS (1977) Relationship of microvascular disease in diabetes to metabolic control. *Diabetes* **26**, 760–769
- Engerman RL, Finkelstein D, Aguirre G, Diddie KR, Fox RR, Frank RN & Varma SD (1982) Ocular complications. *Diabetes* **31**, Suppl 1, 82–88
- Home Office (1989) *Code of Practice for the Housing and Care of Animals used in Scientific Procedures*. London: HMSO
- Isselkutz B, Isselkutz TB, Elahi D & Borkow I (1974) Effect of infusions on the glucose kinetics in alloxan-streptozotocin diabetic dogs. *Diabetologia* **10**, 323–328
- Kern TS & Engerman RL (1987) Kidney morphology in experimental hypoglycaemia. *Diabetes* **36**, 244–249
- Kern TS & Engerman RL (1988) Urinary protein excretion rates in experimentally diabetic dogs and experimentally galactosaemic dogs. *Diabetologia* **31**, 928–932
- Kern TS & Engerman RL (1990) Arrest of glomerulopathy in diabetic dogs by improved glycaemic control. *Diabetologia* **33**, 522–525
- Rakieten N, Rakieten ML & Nadkarni MV (1963) Studies on the diabetic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Reports* **29**, 91–98
- Rerup CC (1970) Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacological Reviews* **22**, no. 4 485–518

Revisión

Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2

J. Arias-Díaz y J. Balibrea

Departamento de Cirugía. Hospital Clínico San Carlos. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. España.

Resumen

Aún persisten múltiples incógnitas acerca de los mecanismos patogénicos de una enfermedad tan prevalente hoy día como es la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). El avance en la prevención y tratamiento de la misma dependerá en gran parte de la comprensión de estos mecanismos y para ello es imprescindible seguir utilizando modelos animales en los que realizar experimentos que serían éticamente inaceptables en humanos.

La DM2 representa un heterogéneo grupo de enfermedades caracterizado por un aumento en la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos y un deterioro en la secreción de dicha hormona por parte de la célula β pancreática, encontrándose ambas anomalías íntimamente imbricadas. La citada heterogeneidad de la DM2 se ve así mismo reflejada en la gran diversidad de modelos animales útiles para su estudio.

Se revisan los principales modelos de DM2, clasificándolos, según su mecanismo de producción, en espontáneos e inducidos. También se distinguen dos categorías en cada uno de ellos: modelos análogos, que intentan imitar a la enfermedad humana, y modelos intrínsecos, con los que se pretende contestar preguntas concretas de aspectos específicos de la misma.

La decisión acerca del modelo a usar para un experimento en particular es a menudo multifactorial. De modo ideal, los experimentos deberían ser llevados a cabo en varios modelos diferentes, teniendo en cuenta que ninguno de ellos refleja por completo la complejidad de la DM2 humana y que se deben extremar las precauciones a la hora de hacer cualquier tipo de extrapolación a la clínica.

(*Nutr Hosp.* 2007;22:160-68)

Palabras clave: *Diabetes mellitus tipo 2. Modelos experimentales diabetes. Ratas BB. Síndrome metabólico. Resistencia insulínica.*

ANIMAL MODELS IN GLUCOSE INTOLERANCE AND TYPE-2 DIABETES

Abstract

There still are many unknown facts about the pathogenic mechanisms of such a prevalent disease nowadays as type-2 diabetes mellitus (DM2). The advances in diabetes prevention and management will greatly depend on the understanding of these mechanisms; therefore, it will be essential to keep on using animal models on which carrying out experiments that would be unethical in humans.

DM2 represents a heterogeneous group of diseases characterized by an increase in insulin resistance at peripheral tissues and a deterioration in insulin secretion by pancreatic β -cells, both abnormalities being highly interwoven. The mentioned heterogeneity of DM2 is also reflected by the high diversity of useful animal models for its study.

The main DM2 models are reviewed, classifying them by their mechanism of action in spontaneous or induced. Also, two categories in each one of them are distinguished: analogous models, which try to imitate the human disease, and intrinsic models, with which we pretend to answer specific questions about the disease.

The decision about which model to use for a particular experiment usually is multifactorial. Ideally, the experiments should be carried out in several different models, taking into account that none of them completely reflects the complexity of human DM2 and that precautions should be taken when trying to extrapolate the findings to the clinical practice.

(*Nutr Hosp.* 2007;22:160-68)

Key words: *Diabetes mellitus type 2. Diabetes mellitus. Experimental. Rats. Inbred BB. Metabolic syndrome X. Insulin resistance.*

Correspondencia: Javier Arias-Díaz
Departamento de Cirugía. Hospital Clínico San Carlos
Facultad de Medicina. Universidad Complutense
Ciudad Universitaria
28040 Madrid
E-mail: javardi@gmail.com

Recibido: 2-XI-2006.
Aceptado: 9-XI-2006.

Introducción

La diabetes mellitus comprende un espectro de enfermedades con una característica común: la hiperglicemia. Ésta puede ser debida a un déficit casi absoluto de insulina (diabetes tipo 1, diabetes juvenil o insulina-dependiente) o a un déficit relativo de la misma (diabetes tipo 2). Las manifestaciones clínicas de la diabetes tipo 1 se conocen desde antiguo, aunque sólo en fecha relativamente reciente se ha reconocido su patogenia autoinmune. En el caso de la diabetes tipo 2, las células β pancreáticas no pueden secretar insulina de modo adecuado, generalmente en presencia de un aumento progresivo de la resistencia periférica a dicha hormona. Aún persisten múltiples incógnitas acerca de los acontecimientos que dan lugar a la disfunción de la célula β , tanto a nivel fisiológico como molecular. La comprensión de los mismos es imprescindible para el avance en la prevención y tratamiento de esta enfermedad, que ya afecta a cerca de 150 millones de personas en todo el mundo.

Todavía hay muchos impedimentos para el estudio de la diabetes en seres humanos. Éstos incluyen heterogeneidad genética, una esperanza de vida larga, una amplia diversidad de estilos de vida, relativa inaccesibilidad a tejidos y órganos y, por supuesto, consideraciones de tipo ético. El uso de modelos animales soslaya algunos de estos problemas, pero, obviamente, la extrapolación de resultados de animales al hombre (y viceversa) conlleva cierto riesgo. No obstante, las ventajas inherentes a la experimentación animal han permitido obtener gran cantidad de información valiosa acerca de la patogénesis de la enfermedad. En 1922, Banting, Best, Collip y colaboradores publicaron su histórico artículo describiendo la curación de la diabetes mellitus en un perro¹. A partir de entonces se utilizaron ampliamente tanto perros como animales de otras especies para analizar diversos parámetros biológicos y fisiológicos de la diabetes.

Diabetes tipo 1

Tras el descubrimiento de la insulina, la disponibilidad de modelos animales para el estudio de la patogénesis de la diabetes tipo 1 se demoró sin embargo otros 50 años. Uno de los primeros modelos fue la insulinitis experimental inducida mediante administración de preparaciones de insulina en diversas especies animales. Este tipo de modelos reproducían los hallazgos morfológicos de la insulinitis, pero raramente indujeron hiperglicemia. Más adelante, en ratones, llegaron descripciones de la diabetes con un posible componente inmune tras infección con el virus de la encefalomiocarditis, así como tras la administración de dosis bajas múltiples de estreptozotocina, que inducía tanto insulinitis como hiperglicemia².

Aunque la diabetes espontánea no es una enfermedad exclusiva del hombre, las descripciones de la enfermedad en animales son muy escasas. En 1974, se observó que una rata en los laboratorios de BioBree-

ding en Canadá desarrolló espontáneamente diabetes con insulinitis y cetoacidosis. Algunos años más tarde, un ratón que también desarrolló diabetes e insulinitis espontáneas fue descubierto en el Japón. Ambos modelos, la rata de BioBreeding (BB) y el ratón diabético no-obeso (NOD), se han convertido en los modelos experimentales más importantes de diabetes tipo 1³. La investigación se encuentra más avanzada en el caso del ratón NOD, ya que las tecnologías genéticas tipo knock-out y transgénicos tienen mayor difusión en ratones, así como una mayor variedad de anticuerpos específicos se hallan disponibles comercialmente para esta especie. Además, la rata BB se caracteriza por un tipo de inmunodeficiencia grave, por lo que tiene poco en común con la mayoría de los humanos que sufren diabetes. Durante las últimas dos décadas, han aparecido miles de artículos que, utilizando estos modelos y otros similares, sugieren nuevas hipótesis inmunológicas y novedosas estrategias de intervención terapéutica para la diabetes tipo I.

Diabetes tipo 2

En 1866, G. Harley, un médico inglés, notó que existían, al menos, dos formas diferentes de diabetes mellitus; y, en 1880, E. Lancereaux, hizo la distinción entre las formas de diabetes mellitus del obeso (*diabete gras*) y del delgado (*diabete maigre*)⁴. Aunque la insulina se descubriera en la década de los 20, la comunidad médica seguía perpleja ante las diferentes manifestaciones clínicas de las dos formas de diabetes mellitus. En 1931, W. Falta y R. Boller, describieron la diferencia entre las formas insulina-sensible e insulina-resistente de la enfermedad⁵, pero la primera evidencia directa de que la forma de inicio precoz (juvenil) se diferenciaba de la del adulto por la ausencia de insulina circulante llegó en 1951, con el desarrollo de un bioensayo para detectar insulina en sangre⁶. Poco después se documentó que los extractos de páncreas procedentes de diabéticos juveniles tenían niveles de insulina casi indetectables⁷. Draper y cols., entretanto, habían clasificado la diabetes mellitus en grupo I y II de acuerdo a parámetros físicos (jóvenes delgados y adultos con exceso de grasa corporal, respectivamente)⁸. Lister y cols. insistieron así mismo en esta distinción, y designaron los dos tipos corporales como tipo I y II⁹, pero dicha terminología no tuvo general aceptación hasta 1976, cuando fue reintroducida por A. G. Cudworth¹⁰.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa un heterogéneo grupo de enfermedades caracterizado por un aumento en la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos y un deterioro en la secreción de dicha hormona por parte de la célula β pancreática¹¹. Ambas anomalías se encuentran íntimamente imbricadas, pero, en la mayoría de los enfermos, la resistencia a la insulina precede a la disfunción manifiesta de las células β , y se piensa que tiene su origen en una predisposición genética. Además, puede observarse

disfunción subclínica de las células β en familiares de primer grado no diabéticos de pacientes con DM2, lo cual es consistente con la hipótesis de que el fracaso de la célula β se encuentra también determinado genéticamente¹². Por otro lado, de modo similar a lo que ocurre en los pacientes con diabetes tipo 1, en la gran mayoría de casos de DM2 el control de la glicemia muestra un deterioro inexorable con el tiempo, conduciendo a complicaciones tales como ceguera, neuropatía, nefropatía y enfermedad cardiovascular.

Hoy en día se reconoce que algunos subtipos de DM2 son secundarios a defectos monogénicos, tales como el síndrome juvenil de diabetes del adulto (*maturity-onset diabetes of the young* —MODY—)¹³, síndromes de resistencia grave a la insulina¹⁴ y la llamada diabetes mitocondrial¹⁵. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con DM2, varios (si no múltiples) factores genéticos y ambientales contribuyen tanto al origen como a la progresión y complicaciones tardías de la enfermedad.

La identificación de los genes responsables permitiría avanzar en el conocimiento de los mecanismos que mantienen los niveles normales de glucosa y cuya disfunción provoca la enfermedad. Además, podría ayudar a obtener fármacos antidiabéticos más eficaces, diseñados para contrarrestar la anomalía específica, así como a identificar los individuos de riesgo que más podrían beneficiarse de tratamientos y/o cambios en el estilo de vida antes de que la enfermedad se desarrolle.

La predisposición a la resistencia insulínica y/o a la disfunción de células β se hereda de forma no Mendeliana¹⁶, debido a su heterogeneidad genética y patogénica multigénica. Además, factores medioambientales tales como dieta inadecuada e inactividad física pueden modular las manifestaciones del genotipo (penetrancia incompleta) o bien imitar la contribución genética, dando lugar a fenocopias¹⁷. Así pues los estudios genéticos humanos acerca de la predisposición a la resistencia insulínica están plagados de incertidumbres y se ven complicados además por las considerables variaciones existentes en el pool genético humano. Este es el motivo de que se hayan diseñado multitud de modelos animales (en su gran mayoría, ratones) transgénicos y knock-out, portadores de mutaciones en genes requeridos para la secreción y/o acción de la insulina, como método de análisis de un sistema genético de semejante complejidad.

La obesidad y la consiguiente resistencia a la insulina son un preludio habitual de la DM2 humana. Por tanto, no es de extrañar que se hayan usado modelos animales de obesidad para intentar aprender más sobre la enfermedad humana. Algunas cepas mantienen la euglicemia a base de desarrollar una sólida y persistente respuesta compensadora de las células β , imitando la resistencia a la insulina con hiperinsulinemia asociada. El ratón *ob/ob* y las ratas *fa/fa* ejemplifican dicho fenómeno. Otros, tales como el ratón *db/db* y el *Psammomys obesus* (ver más adelante) desarrollan rápidamente hiperglicemia, ya que sus células β son incapaces de mantener durante toda su vida los elevados

niveles de producción insulínica requeridos. La investigación de estos modelos puede ayudar a explicar porqué algunos humanos con obesidad mórbida nunca desarrollan DM2 mientras que otros desarrollan hiperglicemia con grados de resistencia a la insulina y obesidad relativamente modestos.

Modelos de diabetes tipo 2

La DM2 puede presentarse espontáneamente en los animales, habiendo sido reconocida la enfermedad en diversos mamíferos, incluyendo tanto animales domésticos como ganado y animales mantenidos en cautiverio; puede también ser inducida de forma experimental y, en ocasiones, combinarse ambas causas.

Tal como era de esperar, los modelos animales de DM2 son tan complejos y heterogéneos como lo es el propio síndrome en humanos. En el espectro patogénico de la DM2 se encuentra todo el rango de posibilidades, predominando en algunos animales la resistencia a la insulina mientras que, en extremo opuesto, otros sufren sobre todo disfunción de las células β . También pueden aportar información valiosa para la DM2 humana aquellos modelos donde la intolerancia a la glucosa es parte de un fenotipo más complejo, tal como el que incluye obesidad, dislipemia e hipertensión. No se puede hablar de modelos mejores y peores, pues sólo interpretando los datos procedentes de los diversos modelos es como más probablemente surgirán avances significativos de utilidad para la enfermedad humana.

En una primera clasificación, podemos dividir los modelos de DM2 según su mecanismo de producción en modelos espontáneos e inducidos. Además, en cada uno de ellos se pueden distinguir dos categorías: modelos análogos y modelos intrínsecos (tabla I). Esta

Tabla I
Clasificación de los modelos animales de diabetes mellitus tipo 2

1. Modelos espontáneos

1.1. Modelos análogos

- La rata Goto-Kakizaki (GK)
- El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)
- El ratón KK
- *Psammomys obesus* (rata israelí de la arena)
- La rata OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat*)

1.2. Modelos intrínsecos

- El ratón *db/db*
- El ratón *ob/ob*
- El ratón *Agouti*
- La rata Zucker (*fa/fa*)

2. Modelos inducidos

- 2.1. Inducción hormonal
- 2.2. Administración de fármacos
- 2.3. Manipulación genética

última distinción es más útil en el caso de modelos espontáneos, por lo que sólo la utilizaremos en éstos. Los modelos análogos son útiles como sustitutos de la enfermedad humana, y permiten hasta cierto punto hacerla accesible a la experimentación. Los modelos intrínsecos, a diferencia de los anteriores no tratan de imitar la enfermedad humana, sino que sirven para contestar preguntas concretas de aspectos específicos de la misma. Por ejemplo, existen una serie de mutaciones aisladas que se asocian con obesidad y aparición de DM2 en ratones. Tal como discutimos previamente, en humanos es raro que la obesidad o la diabetes surjan como consecuencia de una mutación única; por tanto esos ratones ejemplifican modelos intrínsecos, no análogos, de diabetes. Sin embargo, de modo inesperado, los estudios con ratones portadores de mutaciones *ob* y *db* condujeron al descubrimiento de una molécula clave involucrada en la fisiología del apetito y la regulación energética, la leptina. Un modelo de DM2 inicialmente intrínseco, como el ratón *db*, se convirtió en un modelo análogo de anomalía en la regulación del apetito. Por tanto, los modelos intrínsecos y análogos pueden intercambiar sus papeles, una vez que aprendemos a reconocer la realidad que hay tras las apariencias.

1. Modelos espontáneos

Se trata de estirpes que se mantienen relativamente inalteradas mediante cruces endogámicos y que proceden bien de un animal en el que se ha detectado diabetes espontánea, bien de una serie de cruces selectivos favoreciendo un determinado rasgo fenotípico de la DM2 humana. A veces no son totalmente “espontáneos” en el sentido que se requieren modificaciones dietéticas adicionales para generar la diabetes en el seno de una predisposición genética, es el ejemplo del *Psammomys obesus* que comentamos más abajo.

1.1. Modelos análogos

Se han sometido a análisis genético un amplio abanico de modelos análogos de DM2 intentando descubrir nuevos genes de susceptibilidad para extrapolar su estudio a humanos. A continuación resumimos los modelos de este tipo más conocidos, destacando por su importancia de dos de ellos: la rata Goto Kakizaki (GK) y el ratón obeso de Nueva Zelanda (*New Zealand Obese*, NZO), una cepa seleccionada por su predisposición a DM2 inducida por obesidad, la cual se asemeja bastante a la DM2 humana.

1.1.1. La rata Goto-Kakizaki (GK)

El mejor modelo espontáneo de DM2 es la rata GK, que fue desarrollado en la década de los 90 por dos investigadores japoneses mediante cruces endogámicos recurrentes de ratas no diabéticas (Wistar), pero con niveles plasmáticos de glucosa en el límite alto de la

normalidad¹⁸. Dicho modelo reproduce bien las principales características de la DM2 humana: hiperproducción de glucosa, reducción de la tolerancia a la misma, deterioro en la secreción de insulina, aumento de la resistencia periférica a la insulina y alteración en el metabolismo lipídico. Típicamente, la glicemia en ayunas está sólo ligeramente elevada, pero aumenta considerablemente tras la ingesta de glucosa. Al nacer, la rata GK presenta un número reducido de islotes de Langerhans¹⁹.

Este modelo sugiere la participación de 6 regiones cromosómicas en la etiología de la enfermedad²⁰⁻²², aunque los genes responsables aún parecen encontrarse lejos de ser identificados. Aparte del determinismo genético, dicho modelo sugiere así mismo la existencia de factores epigenéticos, de tal manera que la hiperglicemia *in utero*, cuando la hembra GK expone a su feto a niveles altos de glucosa, puede ser responsable del desarrollo anormal de las primeras células β en el esbozo pancreático²³, de ahí la idea de que la DM2 humana pueda tener su origen en el desarrollo fetal temprano y permanecer posteriormente latente durante décadas.

Al igual que otros modelos animales de diabetes, la rata GK desarrolla algunas características que pueden ser comparadas con las complicaciones de la diabetes humana, incluyendo lesiones renales²⁴, cambios estructurales en los nervios periféricos²⁵ y anomalías en la retina²⁶. La investigación de estos fenómenos representa otro ejemplo de cómo el uso de modelos animales abre áreas que no podrían ser fácilmente estudiadas en el humano. Por ejemplo, sería éticamente inaceptable llevar a cabo biopsias seriadas de tejido nervioso o renal, y asimismo sería difícil medir las concentraciones intraoculares de factores de crecimiento sin recurrir a dichos modelos. Sin embargo, es cierto que existen diferencias entre las complicaciones observadas en animales y en humanos, y está en discusión si actualmente se dispone de algún modelo animal que refleje de modo fiable las complicaciones de la diabetes humana.

1.1.2. El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)

Se trata de una cepa endogámica de ratones originaria de Nueva Zelanda y seleccionada por obesidad poligénica²⁷. Los ratones NZO de ambos sexos presentan elevado peso desde su nacimiento y aumento de su grasa corporal, que refleja predominantemente hipertrofia de los adipocitos más que hiperplasia de los mismos.

El desarrollo de diabetes en este modelo representa un complejo fenómeno tipo umbral en el que la tasa de adiposidad precoz establece un nivel diabetogénico de resistencia a la insulina²⁸. Los ratones NZO machos desarrollan hipertensión cuando se les somete a una dieta con elevado contenido graso. A las 8 semanas de vida, a pesar de la obesidad, los ratones permanecen normoglicémicos y con niveles plasmáticos de insuli-

na y leptina no demasiado elevados. La hiperglicemia es de aparición tardía (alrededor de la semana 16) y evolución crónica una vez establecida. Como anomalías metabólicas precoces se han documentado tanto resistencia a la insulina como excesiva producción de glucosa por parte del hígado²⁹.

1.1.3. El ratón KK

El ratón de la cepa KK es uno de los modelos poligénicos más adecuados como análogos de la DM2 con obesidad moderada. La cepa original se obtuvo en Japón, mediante cruces seleccionando los individuos con mayor peso³⁰ y, de modo característico, estos ratones adquieren obesidad gradual cuando se hacen adultos, además de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensadora e hiperplasia de células insulares, apareciendo finalmente una discreta hiperglicemia³¹.

La ingesta alimenticia es un factor de importancia para la gravedad del fenotipo diabético y la restricción de la ingesta calórica reduce tanto la obesidad como la hiperglicemia en estos ratones. En diversas partes del mundo se han criado distintas líneas de ratón KK que, debido a la deriva genética y cruces endogámicos, actualmente difieren tanto genotípica —como fenotípicamente entre sí. Por ejemplo, en una cepa de ratón KK el *Azgp1*, un gen que codifica para una glicoproteína, ha sido propuesto como parcialmente responsable de la predisposición a obesidad y diabetes³², pero no está claro que ello sea cierto para otras cepas. Aunque todos los ratones KK proceden en última instancia de la colonia original descrita en 1967³⁰, existen actualmente diferencias en las cepas mantenidas en diferentes laboratorios, debido a la dificultad en asegurar un 100% de homogeneidad genética dentro de las cepas endogámicas, incluso tras numerosas generaciones de cruces selectivos. Además, pueden surgir nuevas mutaciones espontáneas algunas de las cuales pueden quedar “fijadas” en una determinada cepa y no en otras. Esta puede ser la explicación de la falta de concordancia entre estudios diseñados para buscar los loci genéticos que confieren susceptibilidad a la DM2 en este modelo³³. Tales diferencias deben ser siempre tenidas en cuenta cuando se comparan resultados de experimentos similares realizados en distintos laboratorios aunque aparentemente usen el mismo modelo animal de diabetes.

1.1.4. *Psammomys obesus* (rata israelí de la arena)

En su hábitat natural, el *Psammomys obesus* sigue una dieta esencialmente vegetariana, sin embargo, cuando se alimenta con dieta estándar de rata de laboratorio, se hace obeso, resistente a la insulina e hiperglicémico³⁴. Si además se usa una dieta rica en colesterol, los animales desarrollan hiperlipidemia y aterosclerosis³⁵. Al igual que en la DM2 humana, el estado hiperglicémico se asocia con un aumento de los niveles de proinsulina y productos de fragmenta-

ción, presumiblemente debido a la elevada demanda de secreción insulínica por la resistencia periférica a dicha hormona. También se ha encontrado alteración en la biosíntesis de insulina en los islotes de Langerhans³⁶.

Al igual que ocurre con el ratón KK, este modelo es particularmente útil para estudiar los efectos de la dieta y el ejercicio³⁷ sobre el desarrollo de la DM2.

1.1.5. La rata OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat*)

En 1984, dentro de una colonia de ratas Long-Evans (Charles River, Canada), se descubrió una rata con diabetes espontánea, poliuria, polidipsia y discreta obesidad. Desde entonces, se mantiene una línea de ratas procedentes de aquella en la compañía farmacéutica Otsuka y se las denomina por ello OLETF³⁸. Sus características incluyen: a) un desarrollo tardío de la hiperglicemia (tras 18 semanas de edad); b) un curso crónico de la enfermedad; c) discreta obesidad; d) aparición clínica de diabetes principalmente en los machos; e) participación de múltiples genes diabéticos recesivos, la transmisión de uno de los cuales (denominado *odf-1*) se encuentra ligada al cromosoma X, y f) nefropatía diabética, en forma de glomeruloesclerosis difusa y lesiones nodulares. Además, existen alteraciones en los islotes pancreáticos que pueden ser clasificadas en tres estadios: a) precoz (menos de 9 semanas de edad), con discreta infiltración linfocitaria; b) hiperplásico (10-40 semanas de edad), con incremento del número de células y fibrosis dentro o alrededor de los islotes, y c) final (más de 40 semanas de edad), con atrofia de los islotes. Las citadas manifestaciones clínicopatológicas de las ratas OLETF se asemejan bastante a las de la DM2 humana.

Es de destacar que las ratas OLETF son portadoras de un alelo nulo para el gen de la colecistoquinina A (CCK-A), lo cual conlleva una capacidad reducida para procesar las señales gastrointestinales de saciedad tras la ingesta de nutrientes. Esto puede ser la causa de un aumento de la cantidad de alimento en cada ingesta, con hiperfagia y obesidad³⁹. Además, los análisis de patrones de expresión génica hipotalámica indican la presencia de un déficit primario en la señalización del neuropéptido Y en el hipotálamo dorsomedial. Así pues, la obesidad en la rata OLETF puede ser debida al mal funcionamiento de dos vías de regulación, una periférica, como es la saciedad tras la ingesta, y otra relacionada con mecanismos centrales críticos para el mantenimiento del balance energético global⁴⁰.

La DM2 de las ratas OLETF puede ser prevenida eficazmente mediante el ejercicio cuyo efecto protector perdura al menos 3 meses tras el cese del mismo⁴¹. También la administración de insulina logra evitar tanto la disfunción de las células β como los cambios morfológicos en el páncreas⁴².

1.2. Modelos intrínsecos

Existen multitud de modelos portadores de mutaciones localizadas que resultan en rasgos fenotípicos imitando alguna de las manifestaciones clínicas de la DM2. En la mayoría de los casos se trata de modelos murinos, por ser los ratones de nuevo más adecuados que las ratas para las técnicas de manipulación y análisis genéticos. Como comentamos previamente, estos modelos son valiosos sobre todo para el estudio de la fisiología y de los mecanismos patogénicos que intervienen en la DM2 y sus complicaciones tardías. Vamos a comentar aquí brevemente sólo los modelos de este tipo más conocidos.

1.2.1. El ratón *db/db*

El “gen de la diabetes” (*db*) se transmite de modo autosómico recesivo y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria⁴³. La mutación *db/db* muestra muchas de las características de la DM2 humana⁴⁴. La evolución de estos ratones es bifásica, mostrando primero hiperinsulinemia y después hipoinsulinemia. La fase hiperinsulinémica aparece alrededor de los 10 días, acusando ya discreta elevación de la glucemia alrededor del mes y siendo franca la hiperglicemia a las 8 semanas de edad. A los 5 ó 6 meses, el peso corporal comienza a descender en paralelo con una degeneración de las células β de los islotes⁴⁵, entrando en la fase hipoinsulinémica.

1.2.2. El ratón *ob/ob*

A diferencia de los mutantes *db/db*, los ratones *ob/ob* son portadores de una mutación en el gen de la propia leptina⁴⁶. Representa un buen modelo para el estudio de la obesidad, siendo la incidencia de diabetes en estos ratones relativamente baja. Esta cepa tiene además una esperanza de vida más larga y sintomatología menos acentuada que la del mutante *db/db*.

1.2.3. El ratón *Agouti*

El producto del gen *agouti* codifica una proteína de 131 aminoácidos que contiene una secuencia señalizadora. Dicha proteína es producida en el folículo piloso donde actúa paracrinamente como un antagonista del receptor de la hormona estimulante de melanocitos (MSH). Aquí inhibe la producción de eumelanina inducida por la MSH, causando un color amarillento de su pelaje⁴⁷. Además, una proteína relacionada con el *agouti* también es un potente antagonista selectivo de los subtipos 3 y 4 del receptor de la melanocortina (Mc3r y Mc4r), los cuales son expresados en el hipotálamo y están implicados en la regulación del peso corporal. Los ratones homocigotos para diferentes mutaciones, ya sean Ay (letal) o Avy (viable), en el gen *agouti* muestran un fenotipo complejo con obesidad y resistencia a la insulina, además de su típico color amarillo⁴⁷.

En humanos, *agouti* se expresa en varios tejidos, incluyendo el adiposo⁴⁸, sugiriendo que podría estar implicado en la regulación de la homeostasis energética. En un estudio reciente, ratones transgénicos sobreexpresando *agouti* en tejido adiposo mostraron sobre peso sin alteración de su ingesta, indicando que el aumento de su grasa corporal puede ser secundario a alteración de su metabolismo energético⁴⁹. Este hallazgo tiene especial relevancia porque sugiere que la expresión de *agouti* en el tejido adiposo humano tiene importancia fisiológica.

1.2.4. La rata Zucker (*fa/fa*)

También llamada ZDF (*Zucker Diabetic Fatty Rat*) aludiendo a su característico fenotipo obeso. La mutación “fatty” (*fa*) fue publicada por Zucker and Zucker en 1961⁵⁰. Los animales homocigotos para el alelo *fa* (receptor de la leptina no funcionante) son apreciablemente obesos ya a las 3 a 5 semanas de vida. Para la semana 14, su composición corporal consta de más de un 40% de lípidos. La obesidad se hereda de modo recesivo y los animales afectados son hiperlipidémicos, hipercolesterolémicos e hiperinsulinémicos, y desarrollan hipertrofia e hiperplasia adipocitaria, semejando la obesidad humana, por ello la rata Zucker es el mejor conocido y más ampliamente usado modelo genético de obesidad humana de comienzo precoz. La rata ZDF presenta tanto resistencia a la insulina (como resultado del receptor mutado de leptina, que causa obesidad), como inadecuada compensación por parte de la célula β . Esto último parece depender de un defecto transcripcional en la célula β , que se hereda independientemente de la mutación del receptor de la leptina y la resistencia a la insulina⁵¹. Las ratas con genotipos homocigoto dominante (+/+) y heterocigoto (*fa*/+) no presentan obesidad ni hiperglicemia.

La rata Zucker no ha sido utilizada tan extensamente como modelo de DM2, probablemente porque, a diferencia de los ratones *db/db* y *ob/ob*, su hiperglicemia es discreta⁵², existiendo variaciones entre colonias. Sin embargo, presenta algunas complicaciones similares a la DM2 humana⁵³, así como hiperinsulinemia secundaria a resistencia periférica a la insulina, la cual es especialmente marcada en el músculo e hígado⁵⁴.

2. Modelos inducidos

Se pueden reproducir en animales una o más de las manifestaciones clínicas de la DM2 humana mediante diversos métodos, siendo los más utilizados actualmente los métodos genéticos que generan modelos intrínsecos con mutaciones específicas.

2.1. Inducción hormonal

La administración de corticoides en diversos períodos de la vida del animal puede causar un estado simi-

lar a la DM2 humana⁵⁵, este modelo sería especialmente apropiado para el estudio de la DM2 que aparece en humanos trasplantados o en tratamiento esteroideo crónico por otro motivo, pudiendo considerarse por tanto un modelo de los que hemos clasificado como “análogos”. Otras hormonas que pueden causar hiperglicemia en animales son la somatostatina, el glucagon, las catecolaminas y la tiroxina.

2.2. Administración de fármacos

Otros modelos están basados en la administración de determinadas sustancias con efectos tóxicos sobre las células β . Por ejemplo, la estreptozotocina (STZ), un antibiótico utilizado en la quimioterapia del cáncer, induce DM2 en roedores recién nacidos no predispuestos, mediante la destrucción de sus células β . Otro fármaco utilizado a veces con el mismo fin es el aloxano⁵⁶.

La STZ es un derivado de la nitrosourea aislado del *Streptomyces achromogenes* con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro⁵⁷. Se trata de un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa⁵⁸ y la función de la glucocinasa⁵⁹, e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA⁶⁰. En este sentido, la STZ actúa como un caballo de Troya, ya que su molécula consta esencialmente de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea, y como tal es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa. Una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica. Dado que las células β pancreáticas son más activas que las demás en la captación de glucosa (tienen que monitorizar continuamente sus niveles plasmáticos), también resultan más sensibles al efecto tóxico de la STZ.

La sensibilidad a la STZ varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. El modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. Una única dosis importante de estreptozotocina puede inducir diabetes en roedores, probablemente debido a efecto tóxico directo. De modo alternativo, se puede usar en forma de múltiples dosis pequeñas (p. ej., 40 mg/kg en 5 días consecutivos). Administrada de este modo, induce una diabetes insulino-pénica en la que interviene la el sistema inmune, tal como ocurre en la diabetes DM1 humana. El modelo de baja dosis múltiple de estreptozotocina ha sido ampliamente utilizado para estudiar los acontecimientos inmunológicos que conducen a la insulinitis y muerte celular β ⁶¹⁻⁶⁴, sin embargo, sigue produciendo diabetes incluso en ausencia de células T y B funcionantes⁶⁵, lo que sugiere que, aún a estas dosis, permanece cierto grado de toxicidad sobre las células β , pre-disponiéndolas al fracaso en presencia de algún tipo de sobrecarga o simplemente con el tiempo. De este modo, se ha utilizado el modelo de administración neonatal de STZ como modo de producir un modelo de DM2 en los roedores ya adultos^{66,67}.

La principal ventaja de los modelos basados en administración de fármacos es que el grado de alteración de las células β puede ser regulado de acuerdo con la dosis de toxina administrada. Su gran desventaja reside en que rara vez la diabetes humana es causada por un tóxico de este tipo.

2.3. Manipulación genética

La introducción de las técnicas de biología molecular dio lugar a la aparición de un gran número de modelos animales útiles para el estudio de la DM2. Al modificar genes específicos, dichas técnicas permiten, al menos teóricamente, generar modelos casi “a la carta”, por ejemplo se pueden producir ratones que sobreexpresen o carezcan de una proteína determinada, que sospechamos juegue algún papel en el metabolismo de la glucosa. Este tipo de modelos se ha desarrollado especialmente en ratones debido a que hay más herramientas moleculares y tecnologías disponibles para esta especie⁶⁸.

Los tipos de manipulaciones que afectan a un gen específico y que pueden interesar para producir un modelo son:

- a) Sobreexpresión, da lugar a ratones llamados transgénicos.
- b) Eliminación: da lugar a ratones llamados “knock-out”.
- c) Reemplazo (con una forma alterada): da lugar a ratones llamados “knock-in”.

Los animales transgénicos se obtienen mediante la incorporación de un gen modificado (transgen) en el pronúcleo de un oocito fertilizado, siendo implantado posteriormente éste en una madre adoptiva. El transgen se incorpora de modo aleatorio en el genoma y sólo una pequeña proporción de oocitos fertilizados dará lugar a una primera generación que expresa el gen de interés.

Para obtener animales “knock-out” y “knock-in” se elimina, altera o sustituye el gen correspondiente en células troncales embrionarias, las cuales se inyectan en un embrión precoz, en el cual se integran, dando lugar a animales quiméricos. En los animales en los que las células descendientes de las inyectadas dan lugar a línea germinal, el gen de interés estará en sus gametos y pasará a la descendencia. Con cruces selectivos obtendremos animales con una o con ambas copias del gen alteradas.

En el ratón hay 22.000 a 25.000 genes, de los cuales varios cientos han sido ya selectivamente modificados con el fin de investigar su función. No todas las modificaciones resultan en descendencia viable, lo cual se ha intentado obviar con un refinamiento técnico ulterior, dando lugar a los llamados “knock-out” o “knock-in” condicionales. En esencia, esta variante consiste en hacer que se exprese el gen modificado sólo en determinados tejidos o bien en determinado mo-

mento del desarrollo elegido por el investigador, con lo cual se logra que el ratón se desarrolle y sea viable para poder ser estudiado.

Los modelos generados mediante este tipo de herramientas moleculares no se encuentran sin embargo exentos de limitaciones. Por el simple hecho de aumentar o disminuir la expresión de un gen estamos induciendo la alteración de otros muchos por un mecanismo compensador. Por ejemplo, eliminando por completo el gen del sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS1) serían de esperar consecuencias fisiológicas más importantes que las que se obtienen, dado el papel central que posee dicha proteína en la señalización intracelular⁶⁹, en este caso la redundancia en la cascada de señalización de la insulina es capaz de anular prácticamente por completo los efectos de la manipulación genética. Por el contrario, los “knock-out” homocigotos para el gen del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2) desarrollan diabetes alrededor del día 10 de vida, junto con resistencia hepática a la insulina y reducción en la masa de células β pancreáticas⁷⁰.

Conclusión

Existen multitud de modelos experimentales potencialmente útiles para el estudio de los diversos aspectos de la DM2 humana. La decisión acerca del modelo a usar para un experimento en particular es a menudo multifactorial. De modo ideal, los experimentos deberían ser llevados a cabo en varios modelos diferentes, aunque en la práctica los grupos de investigación tienden a acumular experiencia con una cepa determinada. En cualquier caso, es necesario comprender que, en general, un modelo animal a lo más que puede aspirar es a representar un aspecto o subtipo de DM2 humana, y que, por tanto, hay que extremar las precauciones a la hora de hacer cualquier tipo de extrapolación a la clínica.

Referencias

- Banting FG, Best DH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report. *CMAJ* 1922; 22: 141-146.
- Rossini AA, Mordes JP. Insulin dependent diabetes mellitus, experimental models. En: Roitt IM, editor. *Encyclopedia of Immunology*. San Diego: Academic Press, 1992: 872-877.
- Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Ilar Journal* 2004; 45 (3): 278-291.
- Gale EA. The discovery of type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; 50(2):217-26.
- Falta W, Boller R. Insularer und insulinresistenter diabetes. *Klin Wochenschr* 1931; 10: 438-443.
- Bornstein J, Lawrence RD. Two types of diabetes mellitus, with and without available plasma insulin. *BMJ* 1951; 1:732.
- Wrenshall GA. Extractable insulin of pancreas. *Diabetes* 1952; 1: 87-107.
- Draper G, Dupurtuis CW, Caughey JL. *Human Constitution in Clinical Medicine*. New York: Harper, 1944.
- Lister J, Nash J, Ledingham U. Constitution and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *BMJ* 1951; 1: 376-379.
- Cudworth AG. The aetiology of diabetes mellitus. *Br J Hosp Med* 1976; 16: 207-216.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414 (6865): 799-806.
- Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus —a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 1996; 334 (12): 777-83.
- Stride A, Hattersley AT. Different genes, different diabetes: lessons from maturity-onset diabetes of the young. *Ann Med* 2002; 34 (3): 207-16.
- Krook A, O'Rahilly S. Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; 10 (1): 97-122.
- Maassen JA, LM TH, Van Essen E, Heine RJ, Nijpels G, Jhangir Tafrechi RS, y cols. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes* 2004; 53 (Supl. 1): S103-9.
- Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 2001; 414 (6865): 788-91.
- Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265 (5181): 2037-48.
- Goto Y, Kakizaki M. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med* 1976; 119: 85-90.
- Miralles F, Portha B. Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50 (Supl.) 1: S84-8.
- Galli J, Li LS, Glaser A, Ostenson CG, Jiao H, Fakhrai-Rad H, y cols. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat Genet* 1996; 12 (1): 31-7.
- Gauguier D, Froguel P, Parent V, Bernard C, Bihoreau MT, Portha B y cols. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat Genet* 1996; 12 (1): 38-43.
- Galli J, Fakhrai-Rad H, Kamel A, Marcus C, Norgren S, Luthman H. Pathophysiological and genetic characterization of the major diabetes locus in GK rats. *Diabetes* 1999; 48 (12): 2463-70.
- Gill-Randall RJ, Adams D, Ollerton RL, Alcolado JC. Is human Type 2 diabetes maternally inherited? Insights from an animal model. *Diabet Med* 2004; 21 (7): 759-62.
- Janssen U, Phillips AO, Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes. *J Nephrol* 1999; 12 (3): 159-72.
- Murakawa Y, Zhang W, Pierson CR, Brismar T, Ostenson CG, Efendic S y cols. Impaired glucose tolerance and insulinopenia in the GK-rat causes peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18 (6): 473-83.
- Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Sekine Y, Honmura S, Matsuo K y cols. Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia* 1997; 40 (6): 726-30.
- Bielschowsky M, Bielschowsky F. A new strain of mice with hereditary obesity. *Proc Univ Otago Med Sch* 1953; 31: 29-31.
- Reifsnyder PC, Churchill G, Leiter EH. Maternal environment and genotype interact to establish diabetes in mice. *Genome Res* 2000; 10 (10): 1568-78.
- Veroni MC, Proietto J, Larkins RG. Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice. *Diabetes* 1991; 40 (11): 1480-7.
- Nakamura M, Yamada K. Studies on a diabetic (KK) strain of the mouse. *Diabetologia* 1967; 3 (2): 212-21.
- Ikedo H. KK mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 1994; 24 (Supl.): S313-6.
- Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, Horiuchi S y cols. Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type 2 diabetes model: is Zn-alpha2 glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? *Diabetes* 2003; 52 (8): 2175-81.

33. Shike T, Hirose S, Kobayashi M, Funabiki K, Shirai T, Tomino Y. Susceptibility and negative epistatic loci contributing to type 2 diabetes and related phenotypes in a KK/Ta mouse model. *Diabetes* 2001; 50 (8): 1943-8.
34. Ziv E, Shafir E, Kalman R, Galer S, Bar-On H. Changing pattern of prevalence of insulin resistance in *Psammomys obesus*, a model of nutritionally induced type 2 diabetes. *Metabolism* 1999; 48 (12): 1549-54.
35. Marquie G, Hadjiisky P, Arnaud O, Duhault J. Development of macroangiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of gliclazide. *Am J Med* 1991; 90 (6A): 55S-61S.
36. Cerasi E, Kaiser N, Gross DJ. From sand rats to diabetic patients: is non-insulin-dependent diabetes mellitus a disease of the beta cell? *Diabetes Metab* 1997; 23 (Supl. 2): 47-51.
37. Heled Y, Shapiro Y, Shani Y, Moran DS, Langzam L, Braiman L y cols. Physical exercise prevents the development of type 2 diabetes mellitus in *Psammomys obesus*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282 (2): E370-5.
38. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992; 41 (11): 1422-8.
39. Schwartz GJ, Whitney A, Skoglund C, Castonguay TW, Moran TH. Decreased responsiveness to dietary fat in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *Am J Physiol* 1999; 277 (4 Pt 2): R1144-51.
40. Bi S, Moran TH. Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat. *Neuropeptides* 2002; 36 (2-3): 171-81.
41. Shima K, Shi K, Mizuno A, Sano T, Ishida K, Noma Y. Exercise training has a long-lasting effect on prevention of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats. *Metabolism* 1996; 45 (4): 475-80.
42. Ishida K, Mizuno A, Sano T, Noma Y, Shima K. Effect of timely insulin administration on pancreatic B-cells of Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty (OLETF) strain rats. An animal model of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Horm Metab Res* 1995; 27 (9): 398-402.
43. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ y cols. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84 (3): 491-5.
44. Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284 (6): F1138-44.
45. Like AA, Lavine RL, Poffenbarger PL, Chick WL. Studies in the diabetic mutant mouse. VI. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. *Am J Pathol* 1972; 66 (2): 193-224.
46. Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L y cols. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 1996; 271 (5251): 994-6.
47. Miltenberger RJ, Mynatt RL, Wilkinson JE, Woychik RP. The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome. *J Nutr* 1997; 127 (9): 1902S-1907S.
48. Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS. Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum Mol Genet* 1995; 4 (2): 223-30.
49. Mynatt RL, Miltenberger RJ, Klebig ML, Zemel MB, Wilkinson JE, Wilkinson WO y cols. Combined effects of insulin treatment and adipose tissue-specific agouti expression on the development of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 (3): 919-22.
50. Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.* 1961; 52: 275-278.
51. Griffen SC, Wang J, German MS. A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes* 2001; 50 (1): 63-8.
52. Muller S, Cleary MP. Glucose metabolism in isolated adipocytes from ad Libitum- and restricted-fed lean and obese Zucker rats at two different ages. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187 (4): 398-407.
53. Lash JM, Sherman WM, Hamlin RL. Capillary basement membrane thickness and capillary density in sedentary and trained obese Zucker rats. *Diabetes* 1989; 38 (7): 854-60.
54. Terrettaz J, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Severe hepatic and peripheral insulin resistance as evidenced by euglycemic clamps in genetically obese fa/fa rats. *Endocrinology* 1986; 118 (2): 674-8.
55. Stojanovska L, Rosella G, Proietto J. Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol* 1990; 258 (5 Pt 1): E748-56.
56. Zhao G, Zhang X, Smith CJ, Xu X, Ochoa M, Greenhouse D y cols. Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes. *Am J Physiol* 1999; 277 (1 Pt 2): H268-78.
57. Bono VH, Jr. Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas. *Cancer Treat Rep* 1976; 60 (6): 699-702.
58. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 1998; 47 (1): 50-6.
59. Zahner D, Malaisse WJ. Kinetic behaviour of liver glucokinase in diabetes. I. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes Res* 1990; 14 (3): 101-8.
60. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; 512 (2-3): 121-34.
61. Yang Z, Chen M, Fialkow LB, Ellett JD, Wu R, Nadler JL. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas* 2003; 26 (4): e99-104.
62. Mensah-Brown EP, Stosic Grujicic S, Maksimovic D, Jasima A, Shahin A, Lukic ML. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Mol Immunol* 2002; 38 (12-13): 941-6.
63. Muller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology* 2002; 205 (1): 35-50.
64. Holstad M, Sandler S. A transcriptional inhibitor of TNF-alpha prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice. *J Autoimmun* 2001; 16 (4): 441-7.
65. Reddy S, Wu D, Elliott RB. Low dose streptozotocin causes diabetes in severe combined immunodeficient (SCID) mice without immune cell infiltration of the pancreatic islets. *Autoimmunity* 1995; 20 (2): 83-92.
66. Portha B, Blondel O, Serradas P, McEvoy R, Giroix MH, Kergoat M, y cols. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabetes Metab* 1989; 15 (2): 61-75.
67. García C, Arias-Díaz J, Villa N, Trueba V, Balibrea JL, Vara E. Islets from neonatally streptozotocin treated rats display an increased in vitro sensitivity to tumour necrosis factor. *Diabetologia* 1994; 37 (Supl. 1): A96.
68. Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC. Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. *Physiology (Bethesda, Md)* 2005; 20: 152-61.
69. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hatakawa T y cols. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372 (6502): 182-6.
70. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S y cols. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391 (6670): 900-4.

Manejo del paciente diabético hospitalizado

M. C. CARREÑO HERNÁNDEZ, J. SABÁN RUIZ¹, A. FERNÁNDEZ BALLESTEROS², A. BUSTAMANTE FERMOSEL³, I. GARCÍA POLO⁴, V. GUILLÉN CAMARGO⁵, M. LÓPEZ RODRÍGUEZ⁶, J. A. SÁNCHEZ RAMOS⁷

Hospital Puerta de Hierro. ¹Hospital Ramón y Cajal. ²Hospital Severo Ochoa. Leganés (Madrid). ³Hospital Gregorio Marañón. ⁴Hospital de La Princesa. ⁵Hospital 12 de Octubre. ⁶Hospital La Paz. ⁷Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

Carreño Hernández MC, Bustamante Fermosel A, Fernández Ballesteros A, García Polo I, Guillén Camargo V, López Rodríguez M, Sabán Ruiz J, Sánchez Ramos JA. Manejo del paciente diabético hospitalizado. An Med Interna (Madrid) 2005; 22: 339-348.

INTRODUCCIÓN

El paciente diabético representa un 30-40% de los pacientes atendidos en los Servicios de Urgencias Hospitalarios y un 25% de los hospitalizados, tanto en las áreas médicas como quirúrgicas. Un 50% de ellos no sabe que es diabético. De los que conocen su enfermedad sólo un 10-20% están en revisión periódica por la misma y dispone de al menos una hemoglobina glicosilada realizada en el último año, y una minoría (< 10%) ha recibido una educación diabetológica supervisada. En una mayoría de los casos, la causa del ingreso no es la diabetes sino otra enfermedad intercurrente y, frecuentemente, la diabetes es descompensada por el tratamiento de la misma. De esta forma, el paciente diabético que acude al hospital no llega en las mejores condiciones posibles y lo recibimos infradiagnosticado o con mal control previo, y en los infrecuentes casos en los que estaba bien, se ha descompensado por un proceso agudo y/o por la medicación del mismo.

La problemática del paciente diabético ingresado en un gran hospital no se parece en nada a la de hace 20 años. Ha cambiado la enfermedad, el enfermo y se diría que hasta ha cambiado el médico. Los criterios diagnósticos han sido reiteradamente modificados (1-3) (Tabla I) y el tratamiento ha adquirido tal complejidad que sólo una minoría de médicos se siente cómodo en el manejo de todos los grupos de anti-diabéticos orales, insulinas, o su combinación (4); el enfermo es más mayor y con más peso; en un porcentaje muy alto cumple los criterios de síndrome metabólico y además con frecuencia es portador de una enfermedad crónica, relacionada o no con la diabetes. Ingresa por un episodio agudo, generalmente infección, insuficiencia cardíaca o ambos, y para mayor dificultad en su manejo "no come", ¿se puede

TABLA I

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA DIABETES MELLITUS

1. Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia, polifagia) y concentración de glucosa en sangre al azar $\geq$ de 200 mg/dl
2. Glucosa plasmática en ayunas $\geq$ de 126 mg/dl (más de 8 horas de ayuno)*
3. Glucosa plasmática a las dos horas de la sobrecarga oral de glucosa con 75 mg $\geq$ 200 mg/dl*

*Estos dos puntos deben ser confirmados en una segunda ocasión.

pedir más? En relación con el tipo de médico, el médico internista de un hospital, ya sea grande o pequeño, ha sido injustamente postergado por las otras especialidades médicas durante años, pero en este campo se siente cada vez más útil por tratarse de un enfermo complejo en el cual, la diabetes y las otras enfermedades del paciente se interfieren recíprocamente y el éxito del control metabólico va a depender del manejo integral del mismo. Por otra parte, sólo un buen control garantizará la evolución satisfactoria de una neumonía, insuficiencia cardíaca, sepsis urinaria, infarto de miocardio, etc., por no hablar del éxito quirúrgico.

En referencia a la práctica diabetológica en los pacientes ingresados ¿se están haciendo bien las cosas? ¿Los valoramos correctamente? ¿Estamos aplicando en nuestros enfermos las novedades farmacológicas? ¿Nos preocupamos del seguimiento a su alta, bien por nosotros mismos o remitiéndolos al médico de atención primaria con las recomendaciones más actuales sobre su manejo?

Trabajo aceptado: 4 de abril de 2005

Correspondencia: María Cruz Carreño Hernández. Hospital Puerta de Hierro. C/ San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid

¿Por qué una guía realizada por médicos internistas aquí y ahora?: muchas son las razones que han llevado a este grupo de trabajo, integrado por profesionales de todos los hospitales de Madrid, a desarrollar una nueva guía sin renunciar a su esencia, el enfermo como un todo y la preocupación por una medicina integral que gradúa los problemas y los resuelve en su globalidad. Tras unas jornadas de autocrítica el grupo de trabajo ha entendido que se daban las razones necesarias para su desarrollo y puesta en marcha. Entre dichas razones destacamos la falta de una guía práctica pensada para el enfermo hospitalizado, en su mayoría perfiladas para situaciones de Urgencias o para el seguimiento ambulatorio, la necesidad de unificar estrategias terapéuticas, la falta de incorporación de los nuevos tratamientos al manejo del enfermo en guías previas, la posibilidad de colaborar en protocolos específicos que mejoren la asistencia al paciente diabético. Finalmente, entendemos que el principal beneficiado de la guía va a ser el propio paciente diabético, que sin duda, va a estar a partir de ahora mejor tratado y de una forma colegiada y consensuada.

MOTIVOS DE INGRESO Y EVALUACIÓN GLOBAL DEL PACIENTE DIABÉTICO

Es difícil contemplar todos los posibles escenarios del paciente diabético que ingresa en un hospital. De entrada, nos podemos encontrar con un paciente que no sabía que era diabético en el momento de ingresar y que durante su ingreso se llega a confirmar el diagnóstico. O bien recibir a un enfermo, que ya conocía que era diabético, tipo 1 ó 2, y recibía o no tratamiento para esta enfermedad.

A grandes rasgos, las causas de ingreso pueden estar relacionadas con la propia enfermedad, por otras enfermedades médicas y por patología quirúrgica, electiva o de urgencia (Tabla II). En ese momento del ingreso, es imprescindible realizar una valoración adecuada de la diabetes del paciente tanto del control metabólico de la misma como de la repercusión en órganos diana. En ocasiones parte de esta evaluación se realiza en urgencias, pero, en función de la causa del ingreso del paciente, se puede realizar con más tiempo una vez que el paciente ya ha sido ingresado en planta.

TABLA II

CAUSAS DE INGRESO DE UN PACIENTE DIABÉTICO

—Motivos relacionados con la propia diabetes

- Complicaciones metabólicas agudas de la diabetes
 - * Cetoacidosis diabética
 - * Estado hiperglucémico hiperosmolar
 - * Hipoglucemia con neuroglucopenia
- Diabetes no controlada o hiperglucemia refractaria persistente, asociada con deterioro metabólico

—Patología médica

- Cardiovascular
- Infecciosa
- Otros

—Patología quirúrgica

- Programada
- Urgente

En el momento del ingreso el paciente diabético se puede encontrar fundamentalmente en dos situaciones: con su diabetes descompensada o compensada. Si está descompensada hay que averiguar la causa desencadenante de la descompensación, siendo las infecciones al ingreso la causa más frecuente seguida del incumplimiento u omisión del tratamiento, ausencia del mismo (debut diabético), situaciones de estrés (infarto de miocardio, pancreatitis aguda, cirugía, traumatismo, accidente cerebro-vascular, etc.), ingesta de tóxicos (etanol), uso de fármacos como esteroides, diuréticos, etc. Por otra parte, el paciente con un adecuado control clínico-metabólico suele ingresar por otro motivo como una intervención quirúrgica programada o realización de pruebas diagnósticas.

Es importante conocer el tiempo de evolución de la enfermedad y el tipo de diabetes que padece el enfermo, que fundamentalmente pueden ser la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2, otros tipos de diabetes específicas (síndrome de Cushing, la inducida por fármacos o productos químicos, etc.) y la diabetes gestacional. Hay que evaluar el tratamiento que el paciente recibía y su grado de cumplimiento en cuanto al conocimiento de su enfermedad (educación diabetológica), control dietético, práctica de ejercicio físico y el tipo de medicación o combinación de los mismos.

En primer lugar se ha de tener en cuenta la presencia de complicaciones metabólicas agudas como: cetoacidosis diabética, estado hiperosmolar no cetósico, hipoglucemias y acidosis láctica. En ausencia de las mismas, se debe analizar el grado de control y/o compensación del paciente diabético teniendo en cuenta la valoración de su estado físico y psíquico. Es importante reseñar la presencia de síntomas o signos que indiquen un mal control de la diabetes. Hay que interrogar sobre el hábito tabáquico, alcohólico y tipo de actividad física, así como los antecedentes de factores de riesgo cardiovascular conocidos, como la hipertensión arterial, dislipemia, obesidad, e historia familiar de enfermedad cardiovascular prematura. En la exploración hay que reseñar la talla, el peso, el IMC, el perímetro de cintura, presión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura. Dentro de las determinaciones analíticas es imprescindible realizar el perfil glucémico, fundamentalmente glucemia basal y glucemia post-prandial a distintas horas, el perfil lipídico, evaluación de la función renal con iones, creatinina, aclaramiento de creatinina y elemental de orina (proteinuria, cetonuria, glucosuria, nitritos, alteraciones del sedimento), microalbuminuria y el valor de hemoglobina glicada (HbA1c). Ocasionalmente hay que realizar una gasometría basal arterial si el paciente está descompensado (valoración acidosis) o presenta patología cardio-respiratoria. Además de los factores de riesgo cardiovascular ya mencionados, hay que evaluar la repercusión orgánica de la diabetes. El paciente diabético puede presentar complicaciones crónicas vasculares y neurológicas que afectan a muchos sistemas orgánicos. Las complicaciones crónicas se pueden clasificar en vasculares y no vasculares. A su vez las complicaciones vasculares se subdividen en microvasculares y macrovasculares. Al primer grupo pertenece la *retinopatía*, que es la primera causa de ceguera en EE.UU., consecuencia de la retinopatía progresiva y del edema macular clínicamente importante, por lo que el examen del fondo de ojo es necesario. La *nefropatía* diabética es la primera causa de insuficiencia renal terminal, y una de las primeras causas de morbilidad relacionada con la diabetes mellitus. Es muy importante detectar precozmente la microalbuminuria,

análisis obligado en la valoración de un paciente diabético. La *neuropatía* puede afectar al sistema nervioso somático y autónomo. Se manifiesta en forma de polineuropatía o mononeuropatía somática, así como neuropatía autonómica. Dentro de las complicaciones macrovasculares (ateroesclerosis) hay que evaluar la posible repercusión cardíaca, especialmente en las *coronarias* con datos de cardiopatía isquémica o insuficiencia cardíaca. Por ello siempre se debe realizar un electrocardiograma y una Rx de tórax y, en casos seleccionados, determinación de CPK o troponina o ecocardiograma. En el *territorio vascular* periférico (fundamentalmente en miembros inferiores) puede producir arteriopatía con dolor, claudicación intermitente y necrosis o gangrena. El índice de tobillo-brazo es útil para evaluar la presencia de lesión periférica en ausencia de síntomas ($\geq$ a 0,9). En el *sistema carotídeo y basilar* puede producir cuadros isquémicos cerebrales agudos y crónicos. No está indicado hacer ningún tipo de estudio, salvo que existan síntomas o se incluya en algún tipo de estudio.

TRATAMIENTO INICIAL DEL DIABÉTICO INGRESADO EN MEDICINA INTERNA

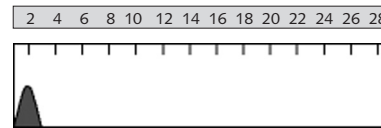
Con respecto al control de la glucemia el *objetivo* es de sobra conocido: mantener una glucemia que evite la cetosis, con la intención de obtener una glucemia preprandial de 110 mg/dl o postprandial de 180 mg/dl, evitando la aparición de hipoglucemias (5).

Uno de los pilares del tratamiento del diabético es un *control dietético* adecuado, pero en el momento del ingreso nos podemos encontrar ante 2 situaciones distintas. La primera es cuando el paciente se puede alimentar. En este caso hay que recordar que se debe prescribir una dieta con horario de diabético, que contenga un 55 a 60% de hidratos de carbono, preferiblemente de absorción lenta y un 10-15% de grasas (ácidos grasos monoinsaturados). Las calorías deben adecuarse a las condiciones del paciente, con un mínimo de 15 kcal/kg/día si el paciente va a estar en reposo y no tiene enfermedad inflamatoria severa; 25 kcal/kg/día si tiene un cuadro de inflamación severa (sepsis, neumonía, enfermedad que requiera cirugía, etc.); y hasta 40 kcal/kg/día si tiene un cuadro de desnutrición severa (IMC < 19). En el segundo caso y quizá una de las situaciones más habituales es cuando el paciente no tolera por vía oral.

Las *antidiabéticos orales* no son útiles en situaciones clínicas en las que las necesidades de insulina y el aporte de glucosa varían rápidamente (6,7). Podrían tener un papel en diabéticos tipo 2, previamente controlados, ingresados de forma programada y en los que no exista una enfermedad o alteraciones dietéticas que faciliten su descontrol. Hay que evitar las sulfonilureas por el alto riesgo de hipoglucemia prolongada, la metformina si hay insuficiencia renal o cardíaca por riesgo de acidosis, y las tiazolidindionas (glitazonas) por la retención de líquido si hay insuficiencia cardíaca, renal, hepatopatía, etc.

El *control ideal y aconsejable del paciente diabético ingresado se debe llevar a cabo con insulina*. Dentro de este manejo se pueden barajar distintas opciones, tanto en el tipo de insulina como en su forma de administración. Conviene, por tanto, conocer los principales tipos de insulina empleados en la actualidad, y las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

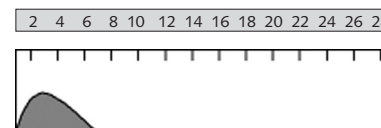
—Insulina ultrarrápida (insulina Lispro, insulina Aspart)



Comienzo: 15 minutos
Pico máximo: 30-70 minutos
Duración: 2-3 horas

Entre sus ventajas, destacan la reducción del aumento postprandial de glucemia y la menor frecuencia de hipoglucemias. No se necesita intervalo de tiempo entre inyección e ingesta (lo que facilita la vida del paciente) y hay una menor diferencia en su absorción según punto de inyección (10,11). Precisa administración de otras insulinas que aporten ritmo insulinémico basal.

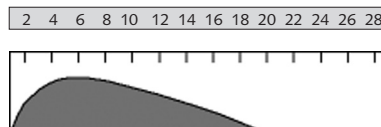
—Insulina regular



Comienzo: 30 minutos
Pico máximo: 1-3 horas
Duración: 6-7 horas

Es la única insulina que puede administrarse no sólo por vía subcutánea, sino también intravenosa, intramuscular e intraperitoneal; es la de elección en embarazadas y gestantes. Precisa la administración de otras insulinas que aporten ritmo insulinémico basal y debe administrarse 30 minutos antes de las comidas.

—Insulina intermedia (NPH)



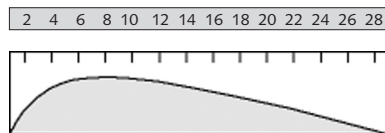
Comienzo: 1 hora
Pico máximo: 2-8 horas
Duración: 18-20 horas

La principal ventaja de este tipo de insulina es la amplia experiencia de uso con ella y que consigue mantener niveles sanguíneos de insulina durante más tiempo que las insulinas rápidas. Sin embargo, desde la aparición de insulina glargina, se han hecho evidentes sus principales desventajas (5), como el riesgo de hipoglucemia y la ausencia de una insulinemia basal uniforme. No suele proporcionar por sí sola niveles adecuados de glucemia, sino que se debe administrar de forma conjunta con otras insulinas rápidas, o bien con antidiabéticos orales.

—Mezclas de insulina (NPH + insulina rápida o ultrarrápida)

Desde la comercialización de la insulina glargina, el uso de las mezclas de insulinas para el tratamiento intensivo de la diabetes es cada vez menor. Prácticamente, la única presentación que continúa en el mercado es la 70/30 (70% de NPH y 30% de insulina rápida). También se dispone de mezclas de NPL con el análogo Lispro o la de NPA con el análogo Aspart. Su principal ventaja es que permite en inyección única, la infusión de dos tipos de insulina. Pero, no es flexible a la hora de variar estas proporciones.

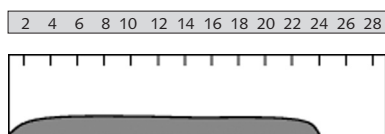
—Insulina ultralenta



Comienzo: 4 horas
Pico máximo: 8-24 horas
Duración: 28 horas

Sus características son similares a la insulina NPH, pero con una duración de acción mayor. El principal inconveniente de su uso es el riesgo de hipoglucemias. Actualmente, ha sido desplazada casi totalmente en sus indicaciones por la insulina glargina.

—Insulina glargina



Comienzo: 1 hora
Pico máximo: no tiene
Duración: 24 horas

Su principal ventaja y que la distingue del resto de insulinas es que proporciona niveles basales constantes de insulina, sin causar picos de acción. Se administra cada 24 horas, a cualquier hora del día pero de forma regular, e independientemente de la ingesta. Consigue eficaz reducción de la HbA1c con mínimo riesgo de hipoglucemias. Sin embargo, al ser una insulina basal, suele ser necesaria la administración conjunta con otras insulinas rápidas, o bien, antidiabéticos orales al no cubrir de forma aislada las necesidades prandiales.

—Bombas de insulina

Se ha extendido su uso en la última década en los pacientes con diabetes tipo 1 (12). Sus puntos positivos fundamentales son que proporciona un ritmo insulínico basal uniforme, posibilidad de uso de ritmos insulínicos suplementarios, pudiendo liberalizar los horarios de las comidas y facilita un control glucémico estricto. No obstante, los problemas locales de colocación de la bomba, la dificultad del manejo por parte del paciente y la carestía del mecanismo dificultan su uso.

FORMAS DE INSULINIZACIÓN DEL PACIENTE HOSPITALIZADO

1. *La insulina rápida en infusión continua* (14,15): es una forma de administrar la insulina infrautilizada en la mayor parte de las plantas de Medicina Interna. Permite un excelente control, con una acción rápida y segura. Hay una serie de condiciones en la que es obligado su uso (Tabla III) y otras en las que podría ser aconsejable. Se deben utilizar siempre con suero glucosado en infusión continua. Para realizar el cálculo de las necesidades de las necesidades basales de insulina se puede considerar que es necesario 1 UI/hora o 0,02 UI/kg/hora. Si el paciente estaba previamente tratado y controlado con insulina subcutánea, se debe calcular la dosis total utilizada en las 24 horas previas al ingreso y pautar el 50% de ella en forma de infusión continua. Si el paciente estaba en dieta absoluta, con infusión de sueros, se puede calcular la dosis necesaria utilizando 1 unidad por cada 5 g de glucosa (aproximadamente 5 unidades con cada suero glucosado al 5%). Es convenient-

TABLA III

INDICACIONES DE LA INFUSIÓN CONTINUA DE INSULINA

—Absolutas

Cetoacidosis diabética
Antes de procedimientos quirúrgicos mayores
Mal control con otras pautas en situaciones que requieran control de glucemia estricto
Ayuno prolongado (más de 12 horas) en diabetes tipo 1 y probablemente en diabetes tipo 2
Infarto de miocardio
Enfermo en situación crítica y/o UCI
Después de cualquier trasplante
Shock (típicamente el cardiogénico)
Parto

—Relativas

Hiper glucemia severa asociada a una enfermedad aguda
Tratamiento inicial de la hiper glucemia por esteroides

te monitorizar la glucemia cada 4 horas. En el caso en el que la glucemia no descienda hay que aumentar la infusión en un 50%. Si por el contrario la glucemia desciende por debajo de 100 mg/dL., hay que reducir la infusión un 50%. Todo ello se debe realizar con una serie de órdenes o protocolos muy sencillos para que el personal de enfermería no tenga dudas en la forma de actuar.

2. Administración de *insulina subcutánea (lenta más rápida)*, en paciente ya controlado en casa con insulina. Tras lo comentado previamente sobre la dieta, se puede mantener la pauta de insulina que el paciente traía de casa, disminuyendo ligeramente la dosis de insulina lenta, aproximadamente un 10 a 30%, y menos o nada la insulina rápida (6,15). En esta situación es aconsejable dejar prevista una pauta de insulina rápida “de rescate o pauta deslizante”, para controlar las hiper glucemias en función de los resultados de la glucemia capilar realizados.

3. Administración de *insulina prolongada o intermedia más rápida* (7,14-16) en pacientes que no utilizaban previamente insulina en casa. Esta es la pauta recomendada actualmente para los pacientes que ingresan y la única posible para los enfermos con diabetes tipo 1 que no sufran una descompensación insulínica o que no lleven una bomba de insulina. La insulina lenta, bien la insulina glargina o NPH proporciona la cantidad necesaria para cubrir las necesidades basales de insulina. La insulina rápida o Lispro o Aspart proporciona la necesaria para cubrir las necesidades prandiales (10,11). Para calcular las dosis de insulina requeridas el rango aconsejado es amplio es función del peso. En el caso de *diabetes tipo 1* iniciaríamos la administración con 0,5-1 UI/kg/día en *diabetes tipo 1* y 0,3-0,4 UI/kg/día en *diabetes tipo 2* o el 80% de la cantidad de insulina en infusión que estuviese precisando o el 75% de la insulina rápida subcutánea que precisase. Una vez calculada la dosis requerida diaria de insulina hay que dividir la administración entre los dos tipos de insulina para cubrir los distintos requerimientos de insulina basal e insulina prandial. La insulina “basal” constituye el 60% de la cantidad total calculada, en forma prolongada (glargina) o en forma de insulina lenta (NPH), administradas una vez al día la glargina y 1 ó 2

veces la NPH. La insulina relacionada con la ingesta constituye el 40% de la misma. En forma de insulina rápida, preferiblemente Lispro o Aspart se administra antes de las tres comidas principales (desayuno, comida y cena).

En el caso de la insulina NPH suelen ser necesarios 2 dosis, 2/3 de la misma administrados antes del desayuno, y 1/3 antes de la cena. En los diabéticos tipo 2 también se puede intentar administrar una dosis única en el momento de acostarse. La insulina glargina, que tiene un menor riesgo de hipoglucemias que NPH, sólo requiere una sola dosis, a cualquier hora del día, manteniendo ese horario y variando la dosis en función de la glucemia basal. Si se administra insulina rápida se debe inyectar 30 minutos antes de las comidas, mientras que los análogos de insulina se pueden administrar inmediatamente antes de la ingesta.

Si el paciente estaba con insulina i.v. en perfusión: calcular la dosis diaria de las últimas 24 horas y administrar el 80% de dicha dosis.

4. *Administración exclusiva de insulina rápida subcutánea* (15,17). Esta pauta no es aconsejable como tratamiento exclusivo, pero su uso en el momento del ingreso es una práctica habitual en aquellos pacientes diabéticos que ingresan por cualquier otra patología y en los que es preciso ajustar el tratamiento de su diabetes. No hay evidencia de cómo iniciar la insulinización *de novo* en el paciente ingresado, pero sí muchas “fórmulas”. De entrada, se puede calcular una dosis de 0,2 UI/kg/día, repartidas en tres inyecciones subcutáneas antes de desayuno, comida y cena. Si la cantidad es divisible por tres aplicar tres dosis iguales. Si no lo es inyectar algo más en la dosis de la comida más rica en calorías (en general el almuerzo). Esta pauta no se debe mantener durante más de 48 horas. La dosis orientativa figura en la tabla IV. No controlan al paciente. Tratan la hiperglucemia después de que se produce pero no la previenen. Han demostrado una incidencia de 40% de hiperglucemias y de 23% de hipoglucemias (total 63% de episodios de mal control). El riesgo de hiperglucemia se multiplica por tres, en relación con pacientes no controlados. Sólo se debe utilizar exclusivamente para el tratamiento del diabético, en la urgencia o durante la guardia, durante las primeras horas del ingreso, *sabiendo que no es la pauta adecuada para el control*. Así para un paciente de 70 kilos de peso que ingresa por una sepsis de origen urinario, se le puede administrar una dieta de $25 \times 70 = 1.750$ calorías, la cantidad de insulina rápida ($0,2 \times 70 = 14$) es de 14 unidades/día, divididas en 4-5-5 unidades subcutáneas. La pauta de insulina rápida se debe iniciar siempre con una glucemia “elevada”, habitualmente a partir de 150 mg/dl y por cada aumento de la

glucemia de 50 mg/dl hay que subir 2 unidades de insulina en cada dosis.

5. *Transición de insulina rápida a insulina lenta* (15,18): Para calcular la dosis de NPH que requiere una paciente hay que conocer la dosis de insulina rápida diaria que precisa el paciente para su control y calcular entre un 50 y 75% (o dos tercios o 66%) y aplicarla en dos dosis. Dos tercios de la dosis total antes del desayuno y un tercio antes de la cena. Si un paciente precisa 30 unidades de insulina rápida, necesitará unas 20 unidades de NPH o lo que es lo mismo 14 unidades antes del desayuno y 6 antes de la cena. Si por el contrario decidimos utilizar *insulina glargina* se calcula un 50% de la dosis de insulina rápida precisa para el control del paciente en una sola dosis, a cualquier hora del día, manteniendo ese horario y variando la dosis en función de la glucemia basal. En el caso anterior necesitaría 15 unidades de insulina glargina.

6. *Control inicial con insulina lenta* (15,18). En pacientes en los que se prevea que no van a necesitar la insulina a largo plazo, se puede intentar un control con una dosis única de insulina. Es probable que se precise insulina de acción corta como suplemento, para controlar las oscilaciones postprandiales, por lo que estaríamos en el punto 3. Los diabéticos tipo 2, con buena “reserva insulínica”, podrían controlarse con esta pauta. Los diabéticos tipo 1 y los tipo 2 con mala reserva insulínica necesitan cubrir sus necesidades de insulina basal y además las prandiales, porque no son candidatos a esta pauta. Por ejemplo, ante un paciente descompensado por tratamiento con esteroides se puede intentar el control inicial con una única dosis de glargina, calculando 0,2-0,3 UI/kg a cualquier hora del día, manteniendo ese horario y variando la dosis en función de la glucemia basal. La administración por la mañana se acompaña de menos episodios de hipoglucemia nocturna (18). También se puede intentar con insulina NPH en dosis única, calculando 0,3 UI/kg/día y administrarla en la cena o después de la misma, o dividirla en 2 dosis. En ambos casos hay que dejar prevista una insulina rápida de rescate para controlar la necesidad de insulina asociada a las comidas o “prandial”.

MANEJO DE SITUACIONES ESPECIALES

PACIENTE QUIRÚRGICO

Existe evidencia que un mejor control de la glucemia en los pacientes sometidos a cirugía condiciona una menor morbi-mortalidad en estos enfermos (19). Es recomendable una evaluación previa a la cirugía, evitando el día de la misma el

TABLA IV

RECOMENDACIONES DE INSULINA SEGÚN GLUCEMIA CAPILAR ANTES DE LAS COMIDAS

Glucosa capilar	Muy sensibles a la insulina	Sensibilidad normal a la insulina	Resistentes a la insulina	Antes de dormir
< 100	0	0	0	
100-149	0-1	0-2	0-5	
150-199	1	2	5	
200-249	2	4	10	
250-299	3	6	15	0-2
300-350	4	8	20	2-4
> 350	5	10	25	4-6

uso de antidiabéticos orales. Si es posible se debe intentar realizar la cirugía por la mañana, cuanto antes. Para aquellos enfermos sometidos a cirugía cardiovascular (20-27) o aquellos que van a ir a la UCI (28,29) existe una indicación clara de administración intravenosa continua de insulina. Esta pauta origina un beneficio que va más allá del control estricto de la glucemia en la que se implica una acción de la insulina como modulador de la reactividad vascular, citocinas inflamatorias, y liberación de ácidos grasos. Se asocia a un aumento de hipoglucemias (5,2 frente a 0,8%) sin trascendencia clínica. Esta pauta, que figura en la tabla V, podría estar indicada igualmente en aquellas cirugías mayores programadas en la que los pacientes estén recibiendo ya insulina o estén con antidiabéticos orales.

TABLA V

PAUTA DE ADMINISTRACIÓN CONTINUA DE INSULINA

1. Paciente en ayunas desde la media noche anterior a la cirugía
2. El día de la intervención no administrar ni antidiabético oral ni insulina subcutánea
3. Antes de la cirugía analizar la glucemia y el potasio
4. Desde primera hora de la mañana administrar en la misma vena, una solución de suero salino normal (250 cc) con insulina rápida (25 unidades de Actrapid o Humilina regular) y suero glucosado al 5%. Infundir con bomba de infusión o microgoteo (Dosiflow)
5. Antes de la cirugía hacer control de glucemia capilar cada 2 horas. Durante la cirugía y en el posoperatorio inmediato control horario. Después cada 2-4 horas hasta estabilización de la glucemia
6. Los ajustes en el ritmo de la infusión se harán según los niveles de glucemia capilar según este cuadro

Glucemia (mg/dl)	Suero salino (ml/h)	Insulina Unidades	Suero glucosado % (ml/h)
< 70	5	0,5	150
71-100	10	1	125
101-150	10	1,5	125
151-200	20	2	100
201-250	30	3	100
25-300	40	4	75
> 300	60	6	50

En aquellos casos en los que no se pauté insulina en la pauta descrita previamente no es correcta la pauta de insulina rápida según glucemia capilar de forma exclusiva. Hay que evaluar las necesidades de insulina basal, y además, los requerimientos prandiales. Si no estaba recibiendo insulina previamente se puede empezar con una dosis de 0,3-0,8 UI/kg/día. De esta dosis aproximadamente el 50-60% como insulina basal y el resto como insulina relacionada con las comidas con ajuste según escala de glucemia capilar. Como orientación en una cirugía no complicada los requerimientos de insulina serían de 0,3-0,4; en enfermedad hepática de 0,4-0,6; en obesidad severa de 0,4-0,6; en infecciones o sepsis de 0,6-0,8, y con tratamiento esteroideo de 0,5-0,8 UI/kg/día.

Para cambiar de la infusión de insulina a insulina subcutánea se deben superponer ambos tratamientos durante 1 ó 3 horas, según la insulina basal que se prescriba (glargina o NPH respectivamente). La cantidad de insulina necesaria se calcula en función de la insulina recibida. Si estaba en ayunas con suero glucosado, la insulina basal necesaria supone el 80% de la recibida con ajuste posterior. Si ya estaba comiendo, la dosis de insulina basal será entre el 50 y 60% de la dosis recibida y el resto como insulina rápida en 3 dosis.

En cirugías ambulatorias o técnicas diagnósticas en los que se prescriba ayunas, pero en las que posteriormente se vaya a reanudar la alimentación de forma inmediata, se puede utilizar la misma dosis de insulina glargina, 1 ó 2 tercios de insulina NPH por la mañana, con uso de insulina rápida cada 4 ó 6 horas según glucemia capilar. Si el paciente estaba recibiendo antidiabéticos orales, con buen control de la glucemia, se puede posponer la toma a la reanudación de la ingesta.

Cuando se inicia tolerancia con dieta líquida es preferible continuar con la perfusión intravenosa de insulina. Las modificaciones de insulina rápida según glucemia capilar se sugieren en la tabla V.

PACIENTE INGRESADO EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS

En esta situación la práctica habitual y lo recomendado en los diferentes trabajos es la insulina intravenosa en infusión con el objetivo terapéutico de una glucemia menor de 110 mg/dl. Con ello se produce una reducción de la mortalidad del 42% en la propia UCI y del 34% en el hospital, reducción en la incidencia de sepsis, días de ventilador y requerimientos de diálisis (27,28). Las necesidades de insulina pueden variar mucho en cada caso dependiendo de la reserva para producir insulina, la sensibilidad previa a la misma, el aporte calórico y la naturaleza y severidad del cuadro que motivó el ingreso. Cualquier algoritmo de tratamiento se debe adaptar a la situación concreta y a las intervenciones terapéuticas que se lleven a cabo.

PACIENTE CON INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

El estudio DIGAMI (*Diabetes Insulin Glucosa in Acute Myocardial Infarction*) mostró una mejoría en la supervivencia global de los pacientes con infarto agudo de miocardio (IMA) en los que se realizaba un buen control de la glucemia desde el ingreso hasta los 3 meses posteriores al IAM (29,30). En los diabéticos conocidos, esta se lleva a cabo mediante una infusión continua de insulina según la pauta descrita previamente para los pacientes en UCI o sometidos a cirugía.

PACIENTES CON ACCIDENTE CEREBROVASCULAR (ACVA)

Parece que existe un cierto grado de correlación entre el nivel de glucosa y la situación final de los enfermos con ACVA. Hay un metanálisis que estudia 26 trabajos publicados entre 1996 y el año 2000, en los que niveles de glucemia superiores a 110 mg/dL se asocian con un peor desenlace, tanto en la mortalidad, como en la capacidad de recuperación. No hay trabajos que evalúen de forma específica y controlada el impacto del control de la glucemia en este subgrupo de pacientes (31,32).

URGENCIAS DIABETOLÓGICAS

Tanto en la cetoacidosis diabética como en el coma hiperosmolar se recomienda la infusión continua de insulina.

En la cetoacidosis diabética lo primero es confirmar el diagnóstico, ingresando al paciente en la UCI si el paciente está en coma o tiene una acidosis extrema con un $\text{pH} < 7$. Hay que determinar los valores de electrolitos (Na, K, Mg, Cl, bicarbonato, fosfato), la situación ácido-base y la función renal para poder hacer el aporte de líquidos de forma adecuada. Es necesaria la administración de 2-3 l de salino al 0,9% en las primeras 1 a 3 horas (5-10 ml/kg/h) sustituyéndolo por suero salino al 0,45% a 150-300 ml/h posteriormente. Cuando la glucemia disminuya por debajo de 250 mg/dl se debe sustituir el suero salino por suero glucosado al 5% más salino a 0,45%, a 100-200 ml/h. Hay que administrar insulina regular 0,1 UI/kg inicialmente; después 0,1 UI/kg/hora en infusión continua. Si no hay respuesta en 2 a 4 horas se debe aumentar de 2 a 10 veces la dosis. No hay que administrar insulina hasta que la cifra de K sea superior a 3,3 mEq/L. Por supuesto, es imprescindible iniciar el tratamiento de la causa desencadenante de la cetoacidosis. Es necesario realizar controles de glucemia capilar cada 1-2 horas y electrolitos cada 4 (especialmente K, bicarbonato y fosfato). Es muy importante el control del K. Si el electrocardiograma es normal, el K es menor de 5,5 mEq/L y la creatinina y la diuresis son normales hay que administrar 10 mEq/h. Si K es menor de 3,5 mEq/L o si se administra bicarbonato administrar 40-80 mEq/h. Hay que continuar con esta pauta hasta que el paciente esté estable, la glucemia se sitúe entre 150 y 250 mg/dl y no exista acidosis. Entonces se puede reducir la perfusión de insulina a 0,05-0,1 UI/kg/h. Cuando el paciente inicie tolerancia oral, se debe reinstaurar la administración de insulina basal, NPH o glargina, además de la insulina prandial, insulina rápida.

La situación hiperosmolar es más frecuente. En esta situación es necesaria la administración de salino al 0,9% en las 2-3 primeras horas. Si la concentración de Na es superior a 150 mEq/L se debe utilizar suero salino al 0,45%. Tras lograr la estabilidad hemodinámica se inicia la administración de suero hiposalino con dextrosa al 5%. El déficit calculado de agua (que suele ser de 9 a 10 l de media) se debe corregir en los siguientes 2 días, con un ritmo de infusión de 200-300 mL/h. En esta situación se debe infundir K en función de las determinaciones del mismo. Se administra insulina rápida en bolus, entre 5 y 10 UI seguida de una infusión continua entre 3-7 U/h. Cuando la determinación de glucemia sea inferior a 250 mg/dL se puede añadir glucosa a la infusión de suero hiposalino, reduciendo la dosis de insulina a 1-2 UI/h.

PARTO

Se recomienda la administración de insulina intravenosa como la previamente descrita en la diabetes tipo I. En la cesárea electiva se puede utilizar lo mismo (33). Hay que recordar que, tras el parto, la resistencia a la insulina del tercer trimestre desaparece al expulsar la placenta, por lo que es necesario la reducción de la dosis de insulina a la situación previa al embarazo.

NUTRICIÓN PARENTERAL

Produce un aumento de las necesidades diarias de insulina. Es aconsejable la infusión continua de insulina para su mejor

control. Se puede realizar administrando la insulina directamente en la nutrición parenteral o bien de forma separada.

USO DE ESTEROIDES

En aquellos casos en los esteroides induzcan un aumento de glucemia menor de 200 mg/dl el uso de antidiabéticos orales puede ser suficiente para controlar la situación. Si la cifra de glucemia en ayunas es superior se debe iniciar tratamiento con insulina, tanto insulina basal con insulina glargina o NPH, como insulina de acción rápida para ajustar la dosis relacionada con las comidas. Aun así, dada la inestabilidad del paciente que requiere esteroides, el uso de insulina, tanto en perfusión continua como la mezcla de rápida y basal, es una pauta más adecuada para el manejo de esta situación.

TRATAMIENTO AL ALTA

Una vez estabilizado al paciente y alcanzados los objetivos planteados, nuestros esfuerzos deben estar centrados en ajustar el tratamiento de cara al alta. Sin pasar por alto la importancia de la educación diabetológica, pilar básico en el tratamiento de estos pacientes: el ejercicio físico y la dieta, lo que será necesario será el ajuste farmacológico (34).

Podríamos considerar que el paciente está estable cuando se alcanzan los objetivos marcados en el capítulo de "tratamiento inicial": durante 2-3 días, glucemias preprandiales de 110 mg/dl y postprandiales de 180 mg/dl. En este momento planteamos un tratamiento que sirva de puente entre el realizado en el hospital y el definitivo, que deberá ser ajustado por su médico de atención primaria o por el médico que ha atendido al paciente en el hospital en su consulta externa.

Fundamentalmente nos encontraremos con pacientes que durante el ingreso habrán recibido: insulina rápida en infusión, insulina rápida subcutánea o insulina basal (glargina o NPH) más insulina rápida subcutánea. Las dos primeras fórmulas son insuficientes como el tratamiento definitivo del diabético, sin embargo la última constituye una pauta de tratamiento definitiva. Valoraremos qué pacientes son candidatos a seguir con ella. Si durante el ingreso se ha iniciado algún tratamiento que pudiera ser definitivo y concluimos que está indicado, no habría que realizar ningún cambio antes del alta. Si por el contrario no fuera así se suspendería o se añadiría lo que considerásemos oportuno.

Un escenario posible es aquel en el que el paciente no sabía que era diabético antes de ingresar y que durante su ingreso ha tenido hiperglucemias. En un principio, la hiperglucemia en ayunas que no tiene una explicación razonable, es virtualmente diagnóstica de diabetes mellitus. Sin embargo para establecer de una forma razonable el diagnóstico se deben excluir otras causas de hiperglucemia no diabéticas que figuran en la tabla VI. Una vez descartadas estas causas los criterios de diabetes quedan bien establecidos. En este sentido la edad nos puede resultar orientativa: pacientes jóvenes, por debajo de 40 años, suelen tratarse de diabetes mellitus tipo 1, los pacientes mayores, en general por encima de 40 años, diabéticos tipo 2, salvo en la diabetes tipo LADA (latente autoinmune del adulto).

El diabético tipo 1, por definición, se va a ir de alta con insulina (35). Tanto las bombas de insulina, mediante la administración de insulina basal más bolos de insulina, como las pautas

TABLA VI

CAUSAS NO DIABÉTICAS DE HIPERGLUCEMIA

- Enfermedad hepatocelular
- Enfermedad crónica e inactividad física prolongada (encamado)
- Hipopotasemia debido a fármacos como diuréticos, hiperaldosteronismo primario, enfermedad renal o alcoholismo
- Estrés secundario a ictus, IAM, cirugía o Sd. febriles
- Endocrinopatías como acromegalia, Sd. o enfermedad de Cushing, hiperfunción corticosuprarrenal, tratamiento prolongado con esteroides, tumores insulares (insulinoma, glucagonoma), feocromocitoma o tirotoxicosis
- Secundario a cirugía gástrica
- Fármacos: esteroides, diuréticos, anticonceptivos orales, Ac. nicotínico, algunos sedantes, antagonistas del calcio, anticonvulsivantes

multidosis (MDI) con análogos de acción prolongada (glargina o NPH) y acción rápida, constituyen en la actualidad formas adecuadas de continuar el tratamiento insulínico en diabéticos tipo 1. Una vez asegurado que el paciente cumple criterios para tratamiento intensivo así como una buena tolerancia al mismo, debe ser remitido al especialista para continuar control.

Cuando ya se ha conseguido estabilizar al paciente con diabetes tipo 2, tras haberle tratado con insulina durante su ingreso, hay que plantear cuál es el mejor tratamiento con el que darle el alta (32). Los estudios epidemiológicos han demostrado que un buen control glucémico ($HbA_{1c} < 7\%$) reduce notablemente la incidencia de complicaciones vascular-

TABLA VII

SULFONILUREAS

Compuesto	Nombre comercial	Presentación (mg/cp)	Dosis inicial (mg/día)	Duración (horas)
Glibenclamida	Daonil®	5	2,5-5	10-16
	Glucolon®	5	2,5-5	10-16
	Euglucon5®	5	2,5-5	10-16
	Norglicem5®	5	2,5-5	10-16
Glipizida	Glibenese®	5	2,5-5	3-6
	Minodiab®	5	2,5-5	3-6
Gliclazida	Diamicon®	80	80	12
	Unidiamicon®	30	30	24
Glimepirida	Amaryl®	2 y 4	1	24
	Roname®	2 y 4	1	24
Gliquidona	Glurenor®	30	15-30	4

Deben administrarse media hora antes de la comida, iniciando tratamiento con dosis bajas por la mañana y ajustando progresivamente. Efecto secundario más importante: la hipoglucemia y más frecuente: aumento de peso. En ancianos son de elección los de vida media corta (glipizida y gliclazida). Tanto la glimepirida como la gliclazida (Unidiamicon®) se pueden administrar una vez al día, por la mañana. Están contraindicados en la insuficiencia renal (si es leve puede emplearse la glimepirida o gliquidona) y en la insuficiencia hepática (si es leve puede emplearse glipizida o tolbutamida).

res, lo que representa para el paciente una mejor calidad y esperanza de vida (estudio UKPDS). Debe exigirse una corresponsabilidad del paciente basada en una educación adecuada que garantice una monitorización frecuente del tratamiento por parte del propio paciente. El abordaje terapéutico de estos enfermos no se tiene que centrar de forma exclusiva en el control de la glucemia. Es igualmente importante controlar la tensión arterial, con unas cifras tensionales menores de 130/80 mmHg, un control lipídico adecuado con cifras de LDL < 100 en prevención primaria y < 70 en prevención secundaria (4,36), uso de ácido acetil-salicílico a dosis bajas, si no existe contraindicación e insistencia en factores no farmacológicos como mantener el peso adecuado, hacer ejercicio continuado y abstenerse del consumo de alcohol y tabaco. La dieta es uno de los pilares básicos porque contribuye a reducir

TABLA VIII

OTROS ANTIDIABÉTICOS

Compuesto	Nombre comercial	Presentación (mg/cp)	Dosis inicial (mg/día)	Duración (horas)
<i>Secretagogos de acción rápida:</i>				
Repaglinida	Novonorm®	0,5-1-2	0,5-1	4-6
	Prandin®			
Nateglinida	Starlix®	60-120	60	3-4
<i>Biguanida:</i>				
Metformina	Dianben®	850	850	12
<i>Inhibidores de la μ-glucosidasa: intestinal:</i>				
Acarbosa	Glucobay®	50-100	50	2-3
	Glumida®			
Miglitol	Diastabol®	50-100	50	2-3
	Plumarol®			
<i>Tiazolidinadionas:</i>				
Rosiglitazona	Avandia®	4-8	4	3-4
Pioglitazona	Actos®	15-30	15	24

Secretagogos de acción rápida: debe iniciarse tratamiento a dosis bajas, entre 1 y 30 minutos antes de las comidas. Es muy importante omitir la dosis en casos de suprimir la ingesta. Son útiles en el control de la hiperglucemia postprandial. Efecto secundario más importante: la hipoglucemia (aunque menos que con SU). Están contraindicados en caso de insuficiencia hepática y renal severas, puede usarse de caso de insuficiencia hepática leve o moderada.

Biguanidas: metformina: en un 30% de los casos produce diarrea, que puede evitarse administrándola con comidas y pautaándola de una forma progresiva, comenzando con dosis bajas y subiéndola de forma paulatina. El efecto secundario más grave es la acidosis láctica. Nunca produce hipoglucemias en ayunas. Está contraindicado en caso de insuficiencia hepática renal o respiratoria grave y en caso de insuficiencia cardíaca congestiva grave.

Inhibidores de la μ glucosidasa intestinal: indicados en los casos de hiperglucemia postprandial con glucemias basales no muy alteradas. El efecto secundario más frecuente es la flatulencia. Nunca produce hipoglucemias en monoterapia. Está contraindicado en insuficiencia renal, cirrosis, síndrome de malabsorción, pancreatitis y trastornos gastrointestinales.

Tiazolidinadionas: la pioglitazona es una buena opción para diabéticos tipo 2 con sobrepeso en los que la metformina está contraindicada. Entre sus efectos secundarios está el aumento transitorio de las transaminasas, anemia leve por hemodilución, discreto aumento de peso y aparición de edemas. Está contraindicada en caso de insuficiencia hepática e insuficiencia cardíaca. En Europa no se admite su uso con insulina, a diferencia con EE.UU., donde sí se utiliza.

el peso, a un buen control de la tensión arterial, mantener un perfil lipídico óptimo y la normalización de la glucemia. El aporte calórico, la composición y distribución de los hidratos de carbono deberán ajustarse individualmente.

Con respecto al tratamiento hipoglucemiante, este debe ser escalonado, sin que el tratamiento con insulina sea obligatoriamente el último escalón.

La insulina glargina puede plantearse como primera línea de tratamiento en distintas situaciones. En primer lugar en aquellos pacientes diabéticos que necesitan ayuda de otra persona, que estén ingresados en instituciones y en quienes la administración de una sola dosis de insulina pueda facilitar su control. También se puede plantear en aquellos diabéticos con muchas hipoglucemias sintomáticas o en aquellos pacientes que además de agentes orales necesitaban antes de su ingreso el tratamiento con insulina (39).

Si el paciente durante su ingreso ha requerido menos de 0,3-0,4 UI/kg/día de insulina se puede plantear el control del mismo con antidiabéticos orales. El orden lógico en la mayoría de los pacientes diabéticos tipo 2 que inician tratamiento sería el uso de antidiabéticos orales (38). Se pueden utilizar en monoterapia y dentro de las posibilidades terapéuticas hay que recordar que en aquellos pacientes obesos se debe iniciar el tratamiento con metformina o glitazonas, en pacientes no obesos u obesos que no se controlan con dieta o metformina se debe plantear el tratamiento con secretagogos, sulfonilureas (Tabla VII) o glinidas (40,41) (Tabla VIII). Un segundo

TABLA IX

ASOCIACIÓN DE ANTIDIABÉTICOS

Asociación	Indicación
<i>Sulfonilurea + metformina</i>	Asociación de elección cuando fracasan alguno de los fármacos en monoterapia. Asociación segura cuando no hay contraindicación para su uso
<i>Sulfonilurea + inhibidores de la α-glucosidasa intestinal</i>	Cuando existe mal control metabólico especialmente a expensas de hiperglucemia postprandial. También cuando esté contraindicada la metformina
<i>Sulfonilurea + tiazolidinadionas</i>	Mejoría del control glucémico con respecto al uso de ambas en monoterapia. Segunda línea indicada en aquellos pacientes en los que está contraindicada la metformina o no fuese tolerada. Produce incremento del peso y del colesterol
<i>Metformina + repaglinida</i>	Es similar a la asociación de SU con metformina. Es preferible en pacientes con riesgo de hipoglucemias o pacientes con riesgo de hiperglucemias postprandiales.
<i>Metformina + tiazolidinadionas</i>	Dado que ambos tienen acción sobre la resistencia a la insulina, potenciándose al actuar la primera sobre el hígado y la segunda preferentemente sobre los tejidos periféricos. No producen aumento de peso

TABLA X

ASOCIACIÓN DE ANTIDIABÉTICOS E INSULINA

<i>Sulfonilures + insulina</i>	Útil en pacientes que no se controlan con monoterapia (fundamentalmente por mantener glucemias en ayunas elevadas) a base de SU o en asociación a metformina y sin sobrepeso. Se puede administrar antes de acostarse o con la cena junto con una SU de vida media corta
<i>Metformina + insulina</i>	Indicado para pacientes con sobrepeso que no se controlan con insulina aislada, metformina en monoterapia o en asociación a SU
<i>Inhibidores de la a. glucosidasa intestinal + insulina</i>	Pacientes en tratamiento con insulina y con un grado de control inadecuado fundamentalmente por mantener glucemias postprandiales elevadas

escalón es la asociación de antidiabéticos orales. Las posibilidades que se pueden llevar a cabo figuran en la tabla IX.

Cuando se produzca una "inadecuación" (concepto introducido por Lebovitz) del tratamiento con los ADO (40), se debe, primero asociar insulina (glargina o NPH) a la terapia oral que tenga el paciente y si posteriormente no se consigue el control con la asociación de ADO + insulina, se pasará a una insulinización total del paciente, mediante el uso de glargina o NPH como insulinas basales y el uso de insulinas pre-prandiales rápidas o análogos rápidos (Lispro o Aspart) (38) (Tabla X). La administración de NPH en única dosis nocturna se puede utilizar en pacientes con reserva insulínica y glucemias basales elevadas. La administración de NPH por la mañana es poco fisiológica aunque puede ser útil en la insuficiencia renal crónica o en las hiperglucemias inducidas por otro tratamiento. La forma más habitual es la administración de dos dosis de NPH. A veces, aun cuando se objetiva buen control con 2 dosis de insulina NPH, se puede plantear el cambio a glargina, que requiere sólo una dosis pinchada, con menor riesgo de hipoglucemias. Si venía recibiendo una sola dosis de insulina NPH, la decisión de cambio a glargina debe individualizarse. En este caso el cambio de NPH en una única dosis a glargina la dosis total se mantiene. Si, por el contrario, estaba recibiendo dos dosis de NPH, la dosis de glargina se debe reducir en un 20-30%. Si la insulina es premezclada, la dosis de glargina también debe reducirse en un 20-30% menos, añadiendo insulina prandial regular o análogo corto. Los ajustes de la insulina glargina en función de la glucemia capilar figuran en la tabla XI.

TABLA XI

AJUSTE DE DOSIS DE INSULINA GLARGINA SEGÚN PERFIL GLUCÉMICO

Niveles de glucemia (autocontrol)*	Modificación de la dosis de glargina (U/I)
> 180 mg/dl	8
140-180 mg/dl	6
120-140 mg/dl	4
100-120 mg/dl	2

*En días consecutivos y sin hipoglucemias graves, con glucemias plasmáticas < 70 mg/dl.

CONSIDERACIONES FINALES

—La hiperglucemia en los pacientes hospitalizados es un problema médico importante con consecuencias serias en cuanto a morbilidad, mortalidad y coste.

—Cada vez existe mayor evidencia que asocia un control mejor de la glucemia con la evolución, no sólo intrahospitalaria sino a medio plazo, de diferentes situaciones clínicas como la cirugía, el ingreso en UCI, el IMA, etc.

—El control de la glucemia durante el ingreso hospitalario se consigue de forma más eficaz con el uso de insulina, bien como infusión continua o de forma subcutánea, asociando distintas insulinas para cubrir las necesidades basales y prandiales.

—Durante el ingreso del paciente diabético es aconsejable evaluar el control de la diabetes y la repercusión de la misma, con objeto de abordar el tratamiento en el momento del alta de forma adecuada, tanto en el control de la glucemia, como de la tensión arterial y los lípidos.

Bibliografía

- Follow up Report on the diagnosis of the diabetes mellitus. The expert committee on the diagnosis and classification of the Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-7.
- Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and ADA diagnosis criteria: The Decode Study Group.
- European Diabetes Epidemiology group. Diabetes Epidemiology Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe. *Lancet* 1999; 354: 617-221.
- American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care* 2005; 28 (Supl. 1): 2005.
- American College of Endocrinology. Position statement on inpatient diabetes and metabolic control. *Endocr Pract* 2004; 10: 77-82.
- Alvin C. Powers. Diabetes Mellitus. En: Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo y Jameson, ed. Principios de Medicina Interna. 15ª ed. McGraw Hill Interamericana, 2001.
- Ahmann AJ. Inpatient management of hospitalized patients with type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rep* 2004; 4: 346-51.
- Dean J, Sharp P. Intensive insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes. *Hosp Med* 2004; 65: 288-92.
- Davis T, Edelman SV. Insulin therapy in type 2 diabetes. *Med Clin North Am* 2004; 88: 865-95.
- Holleman F, Hoekstra JBL. Insulin Lispro. *N Engl J Med* 1997; 337: 176-83.
- Simpson KL, Spencer CM. Insulin Aspart Drugs 1999; 57: 759-65.
- Radermecker RP, Scheen AJ. Continuous subcutaneous insulin infusion with short-acting insulin analogues or human regular insulin: efficacy, safety, quality of life, and cost-effectiveness. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 178-88.
- Ratner R. Insulin glargine versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes. *Drugs Today (Barc)* 2003; 39: 867-76.
- Metchick LN, et al. Inpatient management of diabetes mellitus. *Am J Med* 2002; 113: 317-23.
- Hirsch IB, Farkas-Hirsch R. Sliding scale or sliding scare: it's all sliding nonsense. *Diabetes Spectrum* 2001; 14: 79-81.
- Clement S, Braithwaite SS, Magee MF, et al. Management of diabetes and hyperglycemia in hospitals. *Diabetes Care* 2003; 26: 535-91.
- Queale WS, Seidler AJ, Brancati FL, et al. Glycemic control and sliding scale insulin use in medical inpatients with diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 1997; 157: 545-52.
- Hamman A, et al. A randomized clinical trial comparing breakfast, dinner or bedtime administration of insulin glargine in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1738-44.
- Umpierrez GE, Isaacs SD, Bazargan H, You X, Thaler LM, Kitabchi AE. Hyperglycemia: an independent marker of in-hospital mortality in patients with undiagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 978-82.
- Furnary AP, Zerr KJ, Grunkemeier GL, Heller AC. Hyperglycemia: a predictor of mortality following CABG in diabetics. *Circulation* 1999; 100 (#18): I-591.
- Zerr KJ, Furnary AP, Grunkemeier GL, Bookin S, Kanhere V, Starr A. Glucose control lowers the risk of wound infection in diabetics after open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1997; 63: 356-361.
- Furnary AP, Gao G, Grunkemeier GL, et al. Continuous insulin infusion reduces mortality in patients with diabetes undergoing coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1007-21.
- Furnary AP, Zerr K, Grunkemeier GL, Starr A. Continuous intravenous insulin infusion reduces the incidence of deep sternal wound infection in diabetic patients after cardiac surgical procedures [with discussion]. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 352-62.
- Furnary AP, Chaugle H, Zerr KJ, Grunkemeier GL. Postoperative hyperglycemia prolongs length of stay in diabetic CABG patients. *Circulation* 2000; 102 (#18): II-556.
- Lazar HL, Chipkin SR, Fitzgerald CA, Bao Y, Cabral H, Apstein CS. Tight glycemic control in diabetic coronary artery bypass graft patients improves perioperative outcomes and decreases recurrent ischemic events. *Circulation* 2004; 109: 1497-502.
- Markovitz L, Wiechmann R, Harris N, et al. Description and evaluation of a glycemic management protocol for diabetic patients undergoing heart surgery. *Endocr Pract* 2002; 8: 10-18.
- Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001; 345: 1359-67.
- Krinsley JS. Association between hyperglycemia and increased hospital mortality in a heterogeneous population of critically ill patients. *Mayo Clinics Proc* 2003; 78: 1471-8.
- Malmberg K, Norhammar A, Wedel H, Ryden L. Glycometabolic state at admission: important risk marker of mortality in conventionally treated patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction: long-term results from the Diabetes and Insulin-Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction (DIGAMI) study. *Circulation* 1999; 99: 2626-32.
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet* 2000; 355: 773-8.
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* 2001; 32: 2426-32.
- Kiers I, Davis SM, Larkins R, et al. Stroke topography and outcome in relation to hyperglycaemia and diabetes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 263-70.
- Jovanovic L, Peterson CM. Insulin and glucose requirements during the first stage of labor in insulin-dependent diabetic women. *Am J Med* 1983; 75: 607-12.
- Dewitt DRE, Hirsch IB. Outpatient therapy for type 1 and type 2 diabetes: scientific review. *JAMA* 2003; 289: 2254-64.
- Nuevos abordajes terapéuticos de la diabetes Mellitus tipo1. *Endocrinología y Nutrición* 2004; 5: 277-86.
- Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ, National Heart, Lung and Blood Institute, American College of Cardiology Foundation, American Heart Association Implications of recent trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 2004; 110: 227-39. Review.
- Criterios y pautas de terapia combinada en la diabetes mellitus tipo2: Documento de consenso de la Sociedad Española de Diabetes y la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. *Endocrinología y Nutrición* 2001; 48: 82-97.
- Cabezas-Cerrato J, Cabezas Agrícola JM. Protocolo de tratamiento con insulina. *Medicina* 2004; 16: 1016-17.
- Dunn CJ, Plsker GL, Keatiuf GM, Mc Keage K. Insulina Glargina. An update Review of its use in management of diabetes mellitus drug 2003; 63: 1743-78.
- Levovitz HE. Oral antidiabetic agents: 2004. *Med Clin N Am* 2004; 88: 847-63.
- Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2003; 348: 383-93.

Temas de revisión

Instituto Nacional de Endocrinología

ANIMALES DE LABORATORIO EN LA ENDOCRINOLOGÍA: BIOMODELOS DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1

Dra. Beatriz Hugues Hernandorena,¹ Lic, Julio César Rodríguez González² y Lic. Julio César Rodríguez García³

RESUMEN

En las investigaciones biomédicas se precisa la utilización de los animales de laboratorio como biomodelos naturales o inducidos de diversas enfermedades o procesos morbosos, los cuales ayudan al estudio y la comprensión de la patogenia, fisiología y posibilidades de tratamiento de las mismas. En la endocrinología se utilizan para estudiar estos aspectos de las enfermedades de origen autoinmune o no relacionadas con este sistema, como la diabetes mellitus, disfunciones tiroideas, trastornos de la reproducción y del metabolismo, entre otras, además de constituir un arma importante para investigar las interrelaciones hormonales que ocurren en los individuos normales o enfermos. Se realizó una amplia revisión bibliográfica sobre el tema para brindar una información detallada sobre los modelos animales de diabetes mellitus tipo 1 utilizados en las investigaciones biomédicas, que comprendiera los que se obtienen de forma espontánea e inducida, así como la influencia sobre ellos, de los factores ambientales. Se concluyó que resulta de vital importancia para el logro de las investigaciones básicas *in vivo* mantener un control estricto de las condiciones ambientales en las que desarrollamos nuestras investigaciones y ampliar nuestros conocimientos sobre el tema.

DeCS: ANIMALES DE LABORATORIO; DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDIENTE; INVESTIGACION.

Para realizar cualquier tipo de investigación biomédica se hace preciso experimentar con animales.¹ Los modelos de animales son usados para buscar posibles soluciones a los padecimientos,

enfermedades y alteraciones presentes en los seres humanos.

En el campo de la endocrinología, los biomodelos experimentales son ampliamente utilizados para analizar la etiología,

¹ Médico Veterinario. Diplomado en Homeopatía Veterinaria.

² Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado.

³ Licenciado en Biología. Investigador Agregado.

patogénesis, fisiología y posibilidades terapéuticas de los trastornos endocrinos y aquellos íntimamente relacionados con el sistema nervioso e inmune (trastornos neuroinmunoendocrinos), entre los que se encuentran: la diabetes mellitus, las disfunciones tiroideas, las alteraciones del sistema hipotálamo-hipófisis, de la reproducción y del metabolismo en general.

Teniendo en cuenta la importancia de la experimentación animal en las ciencias biomédicas, nuestro objetivo en el presente trabajo es describir los modelos animales que se emplean en el estudio de las endocrinopatías, basado en nuestra experiencia y en una serie de revisiones bibliográficas actualizadas sobre el tema.

En esta primera parte nos referiremos a los biomodelos de la diabetes mellitus tipo I.

DIABETES MELLITUS

El término diabetes mellitus (DM), describe un trastorno metabólico de etiología múltiple, caracterizado por una hiperglucemia crónica con problemas de metabolización de los carbohidratos, las grasas y las proteínas que resultan de defectos en la secreción de insulina, en su acción o ambas.

Recientemente, se ha establecido una nueva clasificación y nuevos criterios de diagnóstico que tienen en cuenta los avances en el conocimiento de la diabetes.

Antes, se definían principalmente como diabetes tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y diabetes tipo 2 o diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), entre otras clasificaciones.

En la actualidad, los términos DMID y DMNID se reemplazan por DM tipo 1

(DMT 1), DM tipo 2 (DMT2) y se consideran además como categorías: otros tipos específicos y diabetes gestacional.²

En la literatura científica consultada antes de establecerse la nueva estructura, se describen los biomodelos según los criterios anteriores lo cual habrá que tomar en cuenta en este artículo.

MODELOS ANIMALES DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

La DMT1 incluye la mayoría de los casos debidos principalmente a la destrucción de las células β . Incluye 2 tipos: aquellos en los que hay evidencias de un proceso autoinmune y en otros donde la causa es idiopática. En este grupo se incluirán los modelos aceptados para el estudio de la DMID en los que hay problemas autoinmunológicos.

Los animales diabéticos han contribuido a entender las causas, consecuencias y tratamiento de este síndrome metabólico, aunque no representen exactamente los aspectos de la enfermedad en el ser humano.²

En los animales de laboratorio, la diabetes se puede presentar de forma espontánea o inducida experimentalmente por distintos métodos.³

BIOMODELOS ESPONTÁNEOS

Esta enfermedad ha sido estudiada en animales que desarrollan la diabetes insulino dependiente en los que intervienen 2 factores patogenéticos que se complementan: los defectos inmunológicos y la predisposición genética. Se presenta en varias especies de mamíferos como el hamster chino, curieles Hartley, conejos Nueva

Zelandia Blancos, perros Keeshond y monos, los cuales no son lo suficientemente convenientes o comparables con la DMID en seres humanos y están menos caracterizados. Los modelos más representativos son las ratas BB, LETL y los ratones NOD.⁴

Las ratas BB: fueron descubiertas en el laboratorio BioBreeding de Ottawa, Canadá. En otros laboratorios también se han obtenido otras líneas y sublíneas de ratas propensas a la diabetes (diabetes prone o DP o animales resistentes [BB-DR]).^{4,5}

En la tabla 1 se exponen las principales características de las distintas colonias BB diabéticas. Todas ellas son mantenidas en condiciones libres de patógenos específicos (SPF), excepto las BB/Wor que requieren estar libres de anticuerpos virales (VAF).

TABLA 1. Principales colonias y líneas de ratas BB diabéticas y sus características

Colonias	Incidencia de diabetes (%)	Edad de comienzo (días de nacido)
BB/W (Wistar)	<80	80-150
BB/WOR (Worcester)	60-90	60-120
BB/OK (OTTAWA/KARLSBURG)	50	60-120
BB/E	50-60	96+18
BB/MOL	96	56-130

Fuente: Bieg S, Lernmark A. Animals models for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.

En las ratas BB, los síntomas aparecen abruptamente alrededor de los 3 meses de edad. Las manifestaciones incluyen marcada hipoinsulinemia, hiperglucemia (20-30 mmol/L), glucosuria, pérdida de peso, polidipsia, poliuria y cetoacidosis. El análisis patológico de los islotes pancreáticos revela infiltración mononuclear celular y destrucción de las células β .⁵

Se han reportado tratamientos aplicados a las ratas BB que interfieren con la respuesta inmunológica y previenen la diabetes, los cuales incluyen: timentomía neonatal,⁶ irradiación linfoide total,⁷ tratamiento con suero antilinfocítico⁸ o ciclosporina.⁹ Todos estos experimentos han indicado que el sistema inmunológico está directamente vinculado en la patogenia de esta entidad en estos modelos y queda esclarecido que la inmunidad humoral y celular desempeñan un papel importante.

En todos los modelos, la insulinitis precede el comienzo clínico de la enfermedad.¹⁰ Este es un proceso gradual, que varía en los islotes de un mismo individuo y entre los diferentes modelos, ocurre una infiltración de los macrófagos, seguida de infiltración progresiva de células T CD4+ y CD8+, CD4-CD8-NK y linfocitos B.¹⁰ En las ratas BB no diabéticas la insulinitis consiste en una gran infiltración de macrófagos, en el tejido endocrino y el exocrino. Sobre la predisposición genética, en estudios realizados al cruzar distintas líneas BB entre sí con otras líneas consanguíneas se han identificado 3 genes. El primero (iddm1) es el Lyp (linfopenia) autosómico recesivo, localizado en el cromosoma 4 e induce a la ausencia de células T periféricas de las subpoblaciones CD8+ y RT6+ desde el nacimiento.¹¹ El fenotipo diabético en las ratas BB está acompañado por una deficiencia de las células T (linfopenia) y un fenómeno poliendocrinológico como la tiroiditis autoinmune.¹² El segundo gen es el iddm2, MHC (*major histocompatibility complex*) ubicado en el cromosoma 20, haploide e induce susceptibilidad a la insulinitis y a la diabetes. El tercero, iddm3 confiere resistencia a la diabetes.¹¹

La rata LETL (*Long-Evans Tokushima Lean*); manifiesta el cuadro diabético sobre

los 90 d de nacidos, pero a diferencia de las anteriores, no presenta linfopenia, por lo demás, manifiesta los mismos síntomas clínicos y subclínicos de las ratas BB y síntomas similares al ser humano. *Kawano* y otros la reportaron en 1989 como un modelo de la DMT1.¹³ Se plantea que en ellas la diabetes se segrega con al menos 2 genes recesivos. Al igual que los ratones NOD (*non obese diabetic*), estas ratas son capaces de desarrollar un síndrome parecido al de Sjögren, pero no tiroiditis.

Los ratones NOD: estos junto con las ratas BB han ayudado a esclarecer aspectos inmunogenéticos de la enfermedad, especialmente la función de los genes MHC, de citoquinas como las interleuquinas -1 (IL-1) y la identidad de las células que efectúan el ataque inmunológico.⁴ Proceden de una derivación de la sublínea Jc1-ICR que desarrolla cataratas y fue descubierta en 1974, en el Laboratorio de Investigaciones Shionogui, en Osaka.¹⁴

En ellos, la diabetes afecta casi al 10 % cuando se crían en condiciones SPF. En la tabla 2 se muestran las características de algunas colonias y líneas de ratones NOD obtenidas en diferentes laboratorios. Existen otras líneas derivadas de la NOD entre las que se encuentran los NOD/scid, NOD/nu/nu, NOR/Lt y NON/Lt.

Al igual que sucede en las ratas BB, en estos animales, los síntomas son muy parecidos al síndrome diabético tipo 1 del ser humano, pero en ellos aparece además infiltración de las glándulas salivales y lagrimales.¹⁵

La insulinitis comienza aproximadamente a las 6 sem de edad como una agregación linfocítica local cercana a los islotes (periinsulinitis) y progresa lentamente hacia una infiltración masiva de células mononucleares en el comienzo de la clínica. Sin embargo, no todos los animales afectados se convierten en diabéticos, hay numerosos reportes de ratones NOD con periinsulinitis con signos subclínicos. Solo cuando las células invasoras hayan destruido el 95 % de las células β productoras de insulina, es que se manifiesta la diabetes.¹⁶ La insulinitis a su vez puede ser prevenida mediante varios procedimientos inmunomoduladores¹⁷ que comprenden la timectomía neonatal, trasplantes de médula ósea, irradiaciones, transfusión de sangre, ciclosporina A, corticoides, nicotinamida y eliminación de radicales libres.

Genéticamente, el ratón NOD presenta un marcado fondo poligénico. En su genoma, existen más de 17 *locis* sobre al menos 5 cromosomas diferentes, lo que constituye el mayor factor genético el iddm-1 ubicado en el cromosoma 17.¹⁸

TABLA 2. Principales características de algunas colonias y líneas de ratones diabéticos

Colonias	Incidencia de diabetes (%)	Edad de comienzo (días de nacido)
NOD/Lt(<i>Leiter</i>)	90 en hembras 83 en machos	80-200
NOD/Shi (<i>Shionogui</i>)	70-80 en hembras >20 en machos	
NOD/Wehi (<i>Walter and Eliza Hall Institute</i>)	<10 en hembras <1 en machos	150

Fuente: Bieg S, Lernmark A. Animals models for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.

Influencia de los factores ambientales en animales diabéticos espontáneos

Aunque la mayoría de los modelos murinos espontáneos tienen una determinada predisposición genética, la incidencia de la diabetes también depende de condiciones externas.

En primer lugar, es necesario que se críen en condiciones SPF o VAF, como se describió en las ratas BB. Otros factores que pueden actuar sobre la respuesta inmunológica son: los agentes infecciosos, la dieta, las sustancias tóxicas, el estrés crónico y las hormona.⁴

Agentes infecciosos

Los virus y otros agentes patógenos pueden inducir o prevenir la diabetes. En individuos genéticamente susceptibles, ciertos virus la inducen al infectar y destruir las células β .¹⁹ En la tabla 3 se exponen

algunos tipos de virus y su actuación en distintas especies de animales y el hombre.

- **Bacterias y hongos:** Las ratas BB y ratones NOD que son vacunados con el *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) o adyuvante completo de Freund (ACF) que contiene *Mycobacterium tuberculosis*, se protegen del desarrollo de la diabetes si el tratamiento es iniciado durante las dos primeras semanas de vida, a su vez, las enterotoxinas estafilocócicas también la previenen en ratones NOD.^{20,21}
- **La dieta:** Algunos componentes de las dietas estándares para roedores que contienen trigo, soya y alfalfa pueden desencadenar diabetes en las ratas BB y en los ratones NOD. Proteínas y péptidos constituyen factores desencadenantes. Por otra parte, dietas libres de estas sustancias y restringidas de ácidos grasos esenciales, como el ácido

TABLA 3. Algunos virus que inducen DMID en los animales y el hombre

Virus	Hospedero	Características
RNA		
Picornaviridae		
Coxsackie	Ratón Primates no humano Ser humano	Destrucción citolítica de las células β Desarrollo de DMID transitoria Aislado de páncreas de paciente DMID muestra ser diabetogénico en ratón
Encefalomiocarditis (EMC)	Ratón y Hamster	Destrucción citolítica de las células β
Meningovirus	Ratón	Destrucción citolítica de las células β
Fiebre aftosa	Ganado	
Retroviridae		
Retrovirus	Ratón	Desarrollan insulinitis y DMID en ratones NOD
Togaviridae		
Rubéola	Hamster y conejo Seres humanos Ganado	Posible asociación con DMID autoinmune Posible asociación con DMID autoinmune congénita Presunta respuesta autoinmune
Diarrea viral bovina		
Reoviridae		
Reovirus	Ratón	Posible asociación con autoinmunidad y diabetes
DNA		
Parvoviridae		
Virus Kilham de la rata	Rata	Desarrolla autoinmunidad específica celular que induce a DMID

Fuente: Boney A, Gulliam DJ. Animals models of IDDM. En: Pickup C, Williams G. Textbook of Diabetes.

araquidónico, previenen el desarrollo de la diabetes en estos animales.

Las proteínas de la leche de vaca han sido reconocidas como diabetogénicas en ratas BB jóvenes, y trabajos más recientes han contemplado a la albúmina del suero bovino (BSA) como agente inductor potencial de autoinmunidad contra las células β en seres humanos y ratas.²² Sin embargo, los estudios en los animales aún están inconclusos al respecto. En los ratones NOD no parece que la leche de vaca o la BSA tengan efecto sobre la incidencia de la diabetes, mientras que la inducción a la tolerancia a la BSA suministrada en períodos tempranos en la vida, previene la enfermedad en las ratas BB.^{23,24}

- *Sustancias tóxicas:* Algunas drogas causan toxicidad en las células β y pueden provocar la insulinitis y la diabetes. En ratas y ratones, la estreptozotocina (STZ), el alloxan y el vactor inducen diabetes en animales modelos al interferir con el metabolismo celular y como resultado se destruyen las células β . En modelos animales propensos a la diabetes, se puede amplificar la respuesta autoinmune de las células β y acelerar el comienzo de la enfermedad.⁵
- *El estrés crónico:* El estrés afecta el metabolismo de la glucosa de forma primaria por la actuación de varias hormonas contrarreguladoras que son liberadas en respuesta al mismo. Dichas hormonas elevan los niveles de glucosa en sangre y disminuyen la acción de la insulina. Se considera también que el estrés puede influir en ciertas respuestas inmunológicas que llegan a desencadenarlas.²⁵
- *Hormonas:* La incidencia de diabetes en los ratones NOD es mayor en las hembras

que en los machos, sin embargo, cuando los machos son castrados, el comienzo de la enfermedad se acelera. A su vez, cuando las hembras son tratadas con andrógenos, se inhibe el desarrollo de la misma, lo cual sugiere que los andrógenos tienen un efecto inmunosupresor.²⁶

BIOMODELOS INDUCIDOS

Diversos son los métodos que permiten inducir la DMT1, entre los cuales tenemos la manipulación genética, el empleo de agentes infecciosos o sustancias químicas y los procedimientos quirúrgicos.

Manipulación genética

Con el avance de las tecnologías sobre biología molecular y celular, genética y embriología nos enfrentamos con nuevas herramientas a los desafíos de la investigación. Las técnicas de manipulación genética han permitido obtener animales transgénicos y *knockout*, que constituyen el mejor sistema disponible para el estudio de las enfermedades humanas de origen genético.²⁷

Mediante la transgénesis se inserta material genético extraño dentro del genoma de un animal. Los genes exógenos se unen a promotores de un gen endógeno seleccionado, así la expresión del gen exógeno puede ser regulada. Los transgenes incluyen antígenos MHC, citoquinas como el interferón (IFN-), proteínas virales como la del LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) que puede inducir insulinitis y diabetes en presencia de la infección por dicho virus. Ello permite desarrollar líneas de animales diabéticos o resistentes.²⁸

Los animales *knockout* se obtienen mediante técnicas para separar o reemplazar

genes,²⁷ por lo que se pueden crear biomodelos muy controlados genéticamente.

Agentes infecciosos

Como se menciona anteriormente, existen virus que pueden inducir este estado¹⁹ en distintos animales. El más estudiado es el de la encefalomiocarditis (EMC) en sus 2 variantes: el EMC-D que causa diabetes en aproximadamente el 90 % de los animales afectados al ejercer un efecto citotóxico y el EMC-B que es completamente no diabetogénico.

Sustancias químicas

Existen drogas o sustancias químicas ya referidas que son capaces de provocar la diabetes en individuos no diabéticos o estados de hiperglucemia en pacientes ya conocidos. Algunas de estas drogas pueden inducir a la resistencia insulínica o al daño de las células β y provocar la enfermedad. En los animales tienen un efecto similar y los biomodelos son empleados para estudiar la inducción de la diabetes y los efectos metabólicos.

Dentro de estas sustancias se encuentra la STZ que es un antibiótico de amplio espectro citotóxico. Puede ser empleada en ratas, ratones, perros, hamsters, ovejas y monos. Se administra de 2 formas: en dosis altas simples (50-60 mg/kg) por la vía intravenosa o intraperitoneal, que causan la muerte de las células β dentro de las 24 h, este probablemente, es el modelo más usado, o mediante dosis bajas subdiabetogénicas (5mg/kg) repetidas a los 5-6 d, que desarrolla un síndrome en el que aparece insulinitis, modelo que se utiliza para estudiar la vía por la cual se acrecientan los efectos de los agentes β citotóxicos. Otras sustancias son capaces de causar diabetes crónica como

el alloxan, clorotozin, vacor y la ciproheptadina que también son β destructoras, pero con un efecto menor que la STZ, aunque todas son tóxicas. El alloxan causa necrosis, pero no insulinitis, el vacor es un rodenticida capaz de provocar severa insulinodeficiencia en seres humanos. Agentes quelantes de Zn pueden inducir diabetes permanente en ratones y conejos. En ratones, la ingestión de nitrosamidas produce daño a las células β y finalmente, diabetes.^{4,5,29} Los glucocorticoides inducen a una diabetes insulino-resistente, que es posible provocar sobretodo, en los perros y ratas.³⁰⁻³² Hay sustancias activadoras de la inmunidad como el ácido poliiosínico, que pueden prevenir la diabetes en los ratones NOD, la acelera en las ratas BB-DP y la induce en las BB-DR, sin embargo, en las ratas Wistar no tienen efecto.^{32,33}

Procedimientos quirúrgicos

La mayor parte del trabajo inicial sobre la insulina y sus funciones fue realizado en animales pancreatectomizados y desempeñó un papel crucial en el descubrimiento de la insulina y los primeros ensayos terapéuticos. Este modelo crea una condición indistinguible de la diabetes en el ser humano y con él se estudian los efectos colaterales como lesiones hepáticas, renales y de la médula ósea.^{4,30}

Inmunoterapia en animales modelos de DMT1

Muchos aspectos inmunológicos de la DMT1 están representados en varios animales que pueden ser usados para estudios sobre la aplicación de la inmunoterapia en el hombre. En los ratones NOD y las ratas BB, los anticuerpos contra las moléculas MHC clase II, CD4 y CD8, así como el contra receptor de interleuquina 2(IL-2),^{34,35} la administración crónica de la

citoquina, como el factor de necrosis tumoral (TNF-)³⁶ e IL-2³⁷ pueden prevenir la diabetes al igual que las sustancias inmuno-estimulantes como el BCG y el ACF.^{38,39}

La tolerancia crónica a las células β puede ser inducida mediante inyección de antígenos de islotes dentro del timo o por la administración intranasal u oral en ratones jóvenes propensos a la diabetes. La aplicación de insulina profiláctica y de *GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE* (GAD) son blanco inmunológico en el estudio preclínico.⁴⁰

Utilización de los animales de laboratorio para el estudio de la DMT1 en el INEN

En el Instituto Nacional de Endocrinología se realizan investigaciones sobre la DMT1, desde hace más de 15 años, en modelos murinos, como los logrados por *Deas* y otros, que provocaron la inducción de la enfermedad en ratas Wistar con el empleo de STZ o dexametasona.^{31,41}

En conclusión, los modelos animales de diabetes mellitus tipo 1 han contribuido eficazmente a la comprensión de las causas,

consecuencias y tratamiento de éste síndrome metabólico en el ser humano. Estos modelos pueden ser espontáneos o inducidos mediante diferentes metodologías que incluyen la manipulación genética, el empleo de animales infecciosos o sustancias químicas y los procedimientos quirúrgicos.

Conociendo la importancia de los factores ambientales en el desarrollo de esta patología endocrina, resulta de gran importancia el control estricto de las condiciones ambientales en el desarrollo de estos biomodelos, así como durante la realización de las investigaciones en que son empleadas.

El conocimiento de la metodología, la fisiología y el control de estos modelos animales resulta un aspecto esencial a dominar por aquellos investigadores dedicados a las investigaciones básicas, lo que contribuirá a una mejor interpretación y comprensión de los resultados obtenidos y su correcta extrapolación a la patogenia de las patologías humanas objeto de estudio.

SUMMARY

In biomedical research, it is necessary the use of laboratory animals as natural or induced models of different diseases or morbid processes that make easy the study and understanding of the pathogeny, physiology and possibilities of treatment of them. In endocrinology, they are utilized to study the aspects of the diseases of autoimmune origin or of those not related to this system, such as diabetes mellitus, thyroid dysfunctions, reproduction and metabolism disorders, among others. Besides, they are also an important tool to investigate the hormonal interrelations occurring in normal or sick individuals. A wide bibliographic review on this topic was made to give a detailed information about the animal models of type I diabetes mellitus used in biomedical research, including those obtained in a spontaneous or induced way, as well as the influence of the environmental factors on them. It was concluded that it is very important for the achievement of the basic research *in vivo* to maintain a strict control of the environmental conditions under which we develop our investigations and to improve our knowledge on this topic.

Subject headings: ANIMALS, LABORATORY; DIABETES MELLITUS, INSULIN-DEPENDENT; RESEARCH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Illera del Portal JC, Illera del Portal JM, Illera Marín M. La experimentación animal y el desarrollo de la investigación. *Rev Hispanoam Anim Exp* 2000;5(4):17-9.
2. Alberti KGMM. El diagnóstico y la clasificación de la diabetes mellitus. *Diabetes Voice* 1999;44(2):35-41.
3. Boney A, Gulliam DJ. Animals models of IDDM. En: Pickup C, Williams G. *Textbook of diabetes*. 2d ed. Blackwell Science, 1998:16.1-16.16.
4. Bieg S, Lernmark A. Animal models for insulin-dependent diabetes mellitus. En: Totowa, NJ. *Contemporary endocrinology autoimmune endocrinopathies*. Human Press 1999:113-39.
5. Petterson A, Jacob H, Lernmark A. Lessons from the animals models: the BB rat. En: Palmer JP, ed. *Diabetes prediction. Prevention and genetic counseling in IDDM*. New York: John Wiley, 1996:182-200.
6. Like AA, Kislauskis E, Williams RM, Rossini AA. Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science* 1992;216:644-6.
7. Rossini AA, Slavin S, Woda BA, Geisberg M, Like AA, Mordes JP. Total lymphoid irradiation prevents diabetes mellitus in the Bio-Breeding/Worcester (BB/Wor) rat. *Diabetes* 1984;33:543-7.
8. Like AA, Rossini AA, Appel MC, Guberski DL, William RM. Spontaneous diabetes mellitus: reversal and prevention in the BB/W rat with antiserum to rat lymphocytes. *Science* 1979;206:1421-3.
9. Laupacis A, Gardell C, Durre J. Cyclosporin prevents diabetes in BB Wistar rats. *Lancet* 1983;1:10-1.
10. Bass J, Kurose T, Pashmforoush M, Steiner DF. Fusion of insulin receptor ectodomains to immunoglobulin constant domains reproduces high-affinity insulin binding in vitro. *J Biol Chem* 1996;271:19367-75.
11. Jacob H, Petterson A, Wilson D, Lernmark A, Lander ES. Genetic dissection of autoimmune type 1 diabetes in the BB rat. *Nature Gen* 1992;2:56-60.
12. Awata T, Guberski DL, Like AA. Genetics of the BB rat association of autoimmune disorders (diabetes, insulinitis y thyroids) with lymphopenia and major histocompatibility complex class II. *Endocrinology* 1995;136:5731-5.
13. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saith Y, Kurosumi M, Natori T. New inbred strain of Long-Evans Tokushima Lean rats with IDDM without lymphopenia. *Diabetes* 1991;40:1375-81.
14. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochima Y. Breeding of non-obese diabetes strain of mice. *Exp Anim* 1980;29:1-13.
15. Berggren PO. New concepts in the pathogenesis of NIDDM. En: Toronto-Stockholm on perspective in diabetes research: advances of experimental medical biology. 2d. ed. New York: Plenum, 1993:24-45.
16. Bjork E, Kampe O, Karlsson FA, Pepeleers DG, Andersson A, Hellerstrom C. Glucose regulation of the antigen GAD 65 in human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1574-6.
17. Tochino Y. The NOD mouse as a model of Type 1 Diabetes. *CRC Crit Rev Immunol* 1987;8:49-81.
18. Podolin PL, Denny P, Lord CJ, Hill J, Todd JA, Peterson LB. Congenic mapping of the insulin-dependent diabetes (Idd) gene, Idd10, localizes two genes mediating the Idd10 effect and eliminates the candidate Fcgr 1. *J Immunol* 1997;159:1835-43.
19. Yoon JW. Environmental factors in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. En: Pickup C, Williams G. *Textbook of Diabetes*. 2d ed. Oxford: Blackwell Science, 1998:14.1-14.14.
20. Bach JF. Insulin dependent diabetes mellitus as an auto-immune disease. *Endocrine Rev* 1994;15:515-42.
21. Kawamura T, Nagata M, Utsugi T, Yson Tw. Prevention of autoimmune type 1 diabetes by CD4+ supressions T cells in superantigen treated non obese diabetic mice. *J Immunol* 1993;151:4362-70.
22. Lefkowitz J, Schreiner G, Cormier J, Handler ES, Driscoll HK, Greiner D, et al. Prevention of diabetes in the BB rat by essential fatty acid deficiency. Relationship between physiological and biochemical changes. *J Exp Med* 1990;171:729-43.
23. Paxson JA, Weber JG, Kulczyck A Jr. Cows and milk-free diet does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1997;46:1771-7.
24. Malkani S, Nompoggi D, Hansen JW, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA. Dietary cow's milk protein does not alter the frequency of diabetes in the BB rat. *Diabetes* 1997;46:1133-40.
25. Surwit RS, Schneider MS. Role of stress in the etiology and treatment of diabetes mellitus. *Psychosomat Med* 1993;55:380-93.
26. Homo-Delache F, Fitzpatrick F, Christeff N, Nuñez EA, Bach JF, Dardenne M. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:619-37.
27. Capecchi MP. The new mouse genetics: altering the genoma by gene targeting. *Trends Gen* 1989;5:70.
28. Kats JD, Wang B, Haskins K, Bernout C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993;74:1089-100.

29. Hsu Wh, Crump MH. Pancreas Endocrino. En: Endocrinología Veterinaria y Reproducción. 4ta ed. Atlampa; Interamericana, Mc Graw-Hill, 1991:179-94.
30. Transient diabetes mellitus associated with prednisone therapy in a dog. J Am Vet Med Assoc 1984;185(3):299-301.
31. Deas M, Crespo S, González R. Estudio del mecanismo de acción hipoglicémante de la Albahaca Morada (*Ocimum Sanctum*). IV. Efecto sobre la resistencia a la insulina inducida por dexametasona en modelos animales. Rev Cubana Farm 1988;22(1):101-8.
32. Ferner RE, Antsiferov ML, Kelman AW, Alberti KG, Rawlins MO. The relationship between dose and concentration of tolbutamide and insulin and glucose responses in the patients with non-insulin-dependent diabetes. Eur J Clin Pharmacol 1991;40:163-8.
33. Serreze DV, Prochazka M, Reifsnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH. Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. J Exp Med 1994;180:1553-8.
34. Boitard C, Michie S, Serruener P, Butcher GW, Larkins AP, Mc Devitt HO. In vitro prevention of thyroid and pancreatic autoimmunity in the BB rat by antibody to class II major histocompatibility complex gene products. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:6627-31.
35. Boitard C, Bendelac A, Richard MF, Carnaud C, Bach JF. Prevention of diabetes in non obese diabetic mice by anti I A monoclonal antibodies transfer of protection by splenic T cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;85:9719-23.
36. Satoh J, Seino H, Shintani S, Tanaka S-I, Ohteko T, Masuda T, et al. Inhibition of type 1 diabetes in BB rats with recombinant human tumor necrosis factor. J Immunol 1990;144:1395-9.
37. Zielasek J, Burkart V, Naylor P, Goldstein A, Kiesel U, Kolb H. Interleukin -2- dependent control of disease development in spontaneously diabetic BB rats. Immunology 1990;69:209-14.
38. Qin HY, Singh B. BCG vaccination prevents insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice after disease acceleration with cyclophosphamide. J Autoimm 1997;10:271-8.
39. Qin HY, Sadelain MW, Hitchon C, Lauzon J, Singh B. Complete freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in non obese diabetic mice. J immunol 1993;150:2092-80.
40. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Leblan RS, Fugger L, Mc Devitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlate with insulinitis in non obese diabetic mice. Nature 1993;366:72-5.
41. Deas M, Menéndez R, Álvarez A, González R. Efecto hipoglicémante de la Albahaca Morada. Rev Cubana Inv Biom 1988;7(1):53-9.

Recibido: 2 de julio del 2001. Aprobado: 24 de septiembre del 2001.

Dra. *Beatriz Hugues Hernandorena*. Instituto Nacional de Endocrinología, Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes

S. Lenzen

Received: 12 September 2007 / Accepted: 8 October 2007 / Published online: 18 December 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Alloxan and streptozotocin are toxic glucose analogues that preferentially accumulate in pancreatic beta cells via the GLUT2 glucose transporter. In the presence of intracellular thiols, especially glutathione, alloxan generates reactive oxygen species (ROS) in a cyclic redox reaction with its reduction product, dialuric acid. Autoxidation of dialuric acid generates superoxide radicals, hydrogen peroxide and, in a final iron-catalysed reaction step, hydroxyl radicals. These hydroxyl radicals are ultimately responsible for the death of the beta cells, which have a particularly low antioxidative defence capacity, and the ensuing state of insulin-dependent ‘alloxan diabetes’. As a thiol reagent, alloxan also selectively inhibits glucose-induced insulin secretion through its ability to inhibit the beta cell glucose sensor glucokinase. Following its uptake into the beta cells, streptozotocin is split into its glucose and methylnitrosourea moiety. Owing to its alkylating properties, the latter modifies biological macromolecules, fragments DNA and destroys the beta cells, causing a state of insulin-dependent diabetes. The targeting of mitochondrial DNA, thereby impairing the signalling function of beta cell mitochondrial metabolism, also explains how streptozotocin is able to inhibit glucose-induced insulin secretion.

Keywords Alkylation · Alloxan diabetes · Cytotoxic glucose analogues · Pancreatic beta cell toxicity · Reactive oxygen species · Streptozotocin diabetes

Abbreviations

GSH glutathione
MNU *N*-methyl-*N*-nitrosourea
NO nitric oxide
PARP poly(ADP-ribose) polymerase
ROS reactive oxygen species
SOD superoxide dismutase

Introduction

Alloxan and streptozotocin are the most prominent diabetogenic chemicals in diabetes research. Both are cytotoxic glucose analogues. Although their cytotoxicity is achieved via different pathways, their mechanisms of beta cell selective action are identical.

In 1838, Wöhler and Liebig [1] synthesised a pyrimidine derivative, which they later called alloxan [2, 3]. In 1943, alloxan became of interest in diabetes research when Dunn and McLetchie reported that it could induce diabetes in animals [4] as a result of the specific necrosis of the pancreatic beta cells [5–7]. The resulting insulinopenia causes a state of experimental diabetes mellitus called ‘alloxan diabetes’ [4, 8, 9]. The reduction product of alloxan, dialuric acid [1], has also been shown to be diabetogenic in animals [10, 11], and to cause ultrastructural changes identical to those observed in response to alloxan [6].

Streptozotocin is an antimicrobial agent and has also been used as a chemotherapeutic alkylating agent [12–14].

S. Lenzen (✉)
Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School,
30623 Hannover, Germany
URL: http://www.mh-hannover.de/klinische_biochemie.html

In 1963, Rakieten et al. [15] reported that streptozotocin is diabetogenic. Again, this insulinopenia syndrome, called ‘streptozotocin diabetes’ [13], is caused by the specific necrosis of the pancreatic beta cells and streptozotocin has been the agent of choice for the induction of diabetes mellitus in animals ever since [3, 16].

After decades of research a unifying explanation for the selective toxicity of these two most prominent diabetogenic agents [2, 17–22] can be provided. Since an understanding of the chemical reactivity of these compounds is crucial for understanding their diabetogenicity, this review will provide an integrated view of their chemical properties and biological effects.

Alloxan diabetes and streptozotocin diabetes

Figure 1 shows a schematic diagram of the tetraphasic and triphasic blood glucose responses induced by alloxan and streptozotocin, respectively, when injected [22]. The responses are accompanied by corresponding inverse changes in plasma insulin and sequential ultrastructural changes resulting in necrotic beta cell death.

A first transient hypoglycaemic phase of up to 30 min starts within minutes of alloxan injection. This short-lived hypoglycaemic response is the result of a transient stimulation of insulin secretion, as documented by an increase in the plasma insulin concentration. The underlying mechanism is a temporarily reduced consumption and increased availability of ATP caused by blockade of glucose phosphorylation through glucokinase inhibition. This initial transient hypoglycaemic phase is not observed in response to streptozotocin

injection, since streptozotocin does not inhibit glucokinase. Morphological alterations are minimal during this phase.

The second phase starts with an increase in the blood glucose concentration, 1 h after administration of the toxins, and a decrease in plasma insulin. This first hyperglycaemic phase, which usually lasts 2–4 h, is caused by inhibition of insulin secretion leading to hypoinsulinaemia. During this phase the beta cells show the following morphological characteristics: intracellular vacuolisation, dilation of the rough endoplasmic reticulum, decreased Golgi area, reduced secretory granules and insulin content, and swollen mitochondria.

The third phase, again a hypoglycaemic phase, typically occurs 4–8 h after the injection of the toxins and lasts several hours. It may be so severe that it causes convulsions, and may even be fatal without glucose administration, in particular when liver glycogen stores are depleted through starvation. This severe transitional hypoglycaemia is produced by the flooding of the circulation with insulin as a result of toxin-induced secretory granule and cell membrane rupture. Pancreatectomy prevents this phase. In addition to the morphological changes seen in the first phase, the beta cell nuclei are pyknotic and show no TUNEL-positive staining; these changes are irreversible.

The fourth phase is the permanent diabetic hyperglycaemic phase. Morphologically, complete degranulation and loss of beta cell integrity is seen within 12–48 h. Non-beta cells remain intact, demonstrating the beta cell-selective character of the toxic action. Cell debris originating from the dying beta cells is removed by non-activated scavenger macrophages.

Thus, injections of alloxan and streptozotocin principally induce the same blood glucose and plasma insulin responses and cause an insulin-dependent type 1-like diabetes syndrome. All of the described morphological features of beta cell destruction are characteristic of necrotic cell death [22]. This mechanism is clearly at variance with that which underlies autoimmune type 1 diabetes, both in humans and rodent models of the disease, where beta cell demise is the result of apoptotic cell death without leakage of insulin from ruptured secretory granules [22].

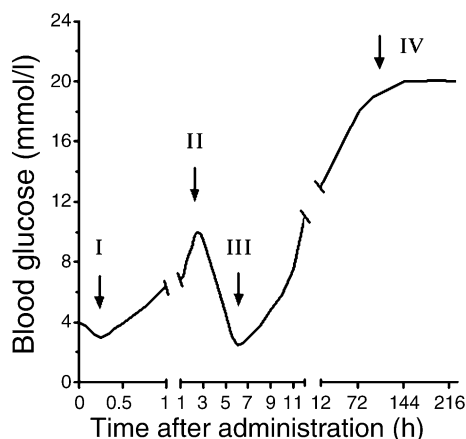


Fig. 1 Phasic blood glucose response to a diabetogenic dose of alloxan (tetraphasic; I–IV) or streptozotocin (triphasic; the first phase does not develop in the case of streptozotocin; II–IV)

Alloxan: mechanism of action

Alloxan has two distinct pathological effects: it selectively inhibits glucose-induced insulin secretion through specific inhibition of glucokinase, the glucose sensor of

the beta cell, and it causes a state of insulin-dependent diabetes through its ability to induce ROS formation, resulting in the selective necrosis of beta cells. These two effects can be assigned to the specific chemical properties of alloxan, the common denominator being selective cellular uptake and accumulation of alloxan by the beta cell.

Beta cell selectivity of alloxan

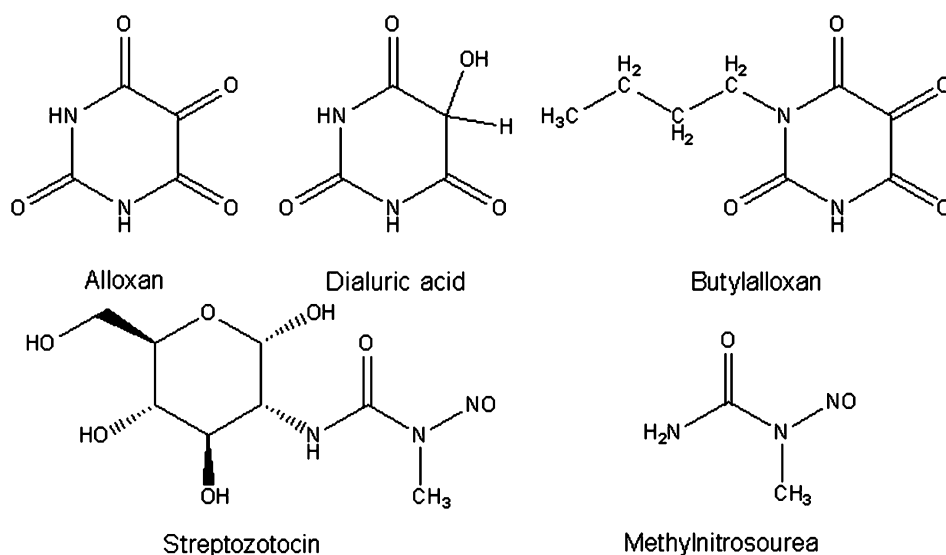
Alloxan is a very unstable chemical compound [23] with a molecular shape resembling glucose (Fig. 2) [24, 25]. Both alloxan and glucose are hydrophilic and do not penetrate the lipid bilayer of the plasma membrane. The alloxan molecule is structurally so similar to glucose that

Comparison of the chemical properties of alloxan and streptozotocin		
	Alloxan	Streptozotocin
Chemical name	2,4,5,6-Tetraoxypyrimidine; 2,4,5,6-pyrimidinetetrone	2-Deoxy-2- ([(methylnitrosoamino)carbonyl]amino)- D-glucopyranose
Chemical structure	Oxygenated pyrimidine derivative; barbituric acid derivative (5- ketobarbituric acid)	Cytotoxic methylnitrosourea moiety (<i>N</i> - methyl- <i>N</i> -nitrosourea) attached to the glucose (2-deoxyglucose) molecule; glucosamine derivative
Chemical properties	Very hydrophilic, beta cell-toxic glucose analogue (partition coefficient –1.8); weak acid	Hydrophilic, beta cell-toxic glucose analogue
	Chemically unstable (half-life of 1.5 min at pH 7.4 and 37° C, decomposing to alloxanic acid); Stable at acid pH ^a	Relatively stable at pH 7.4 and 37° C (at least for up to 1 h) ^b
Chemical reactivities	Thiol reagent that is reduced to dialuric acid in the presence of GSH and other thiols	DNA alkylating agent
	A protoxin; intracellular metabolism of this xenobiotic generates toxic ROS through redox cycling with dialuric acid over a long time period (>1 h)	Protein alkylating agent
	‘Compound 305’, a non-toxic alloxan-GSH adduct of unknown structure with a characteristic absorbance at a wavelength of 305 nm; a small amount is formed during each redox cycle	NO donor
Mode of toxicity	Generation of ROS	DNA alkylation

^aFor experimentation, concentrated stock solutions in 0.01 mol/l HCl, kept on ice, should be used and added to the test medium just prior to the start of the experiment to obtain the final concentration. For injection, the stock solution should be diluted with ice-cold saline (0.9% NaCl) immediately prior to injection.

^bFor in vitro experimentation, concentrated stock solutions in 0.01 mol/l HCl, kept on ice, should be used and added to the test medium just prior to the start of the experiment to obtain the final concentration. For injection, a stable solution in citrate buffer (pH 4.5) is most suitable.

Fig. 2 Chemical formulas of alloxan, dialuric acid, butylalloxan, streptozotocin and methylnitrosourea



the GLUT2 glucose transporter in the beta cell plasma membrane accepts this glucomimetic and transports it into the cytosol [25, 26]. Alloxan does not inhibit the function of the transporter [27], and can therefore selectively enter beta cells in an unrestricted manner [28–30]. It is therefore not toxic to insulin-producing cells that do not express this transporter [27, 31]. The half-life of alloxan is short [23, 32]; in aqueous solution it spontaneously decomposes into non-diabetogenic alloxanic acid within minutes [23]. Because of this, it must be taken up and accumulated quickly in the beta cell [28], and is therefore ineffective when blood flow to the pancreas is interrupted for the first few minutes after alloxan injection [33–35]. N-substituted alloxan derivatives with a long carbon side chain, such as butylalloxan (Fig. 2), differ chemically from alloxan in that they are lipophilic [36]. Butylalloxan acts in a similar manner to alloxan and preferentially damages beta cells [6, 11]. But since derivatives such as butylalloxan are lipophilic they can also penetrate plasma membranes that do not express the GLUT2 transporter [27]. Nephrotoxicity is a dominating feature of the toxicity of lipophilic derivatives after systemic administration [11]. This nephrotoxicity is so severe that it causes fatal renal failure in the animals before diabetes can develop [11]. The susceptibility of the kidney to the toxic action of these lipophilic alloxan derivatives is the result of their preferential accumulation in the tubular cells of the kidney, which, like the beta cells, express the GLUT2 glucose transporter.

Glucokinase inhibition

Selective inhibition of glucose-induced insulin secretion is the major pathophysiological effect of the thiol group reactivity of alloxan [37–39]. Alloxan has a central 5-carbonyl group that reacts very avidly with thiol groups. Glucokinase (hexokinase IV) is the most sensitive thiol enzyme in the beta cell

[2, 40], with a half maximal inhibitory concentration in the 1–10 $\mu\text{mol/l}$ range. At higher concentrations, alloxan can inhibit many functionally important enzymes, as well as other proteins and cellular functions [22, 41].

Inhibition of glucokinase reduces glucose oxidation and ATP generation [42], thereby suppressing the ATP signal that triggers insulin secretion [2]. Inhibition of glucokinase is achieved within 1 min of exposure to alloxan.

The inhibition of glucose-induced insulin secretion is preceded by a very transient (1–2 min) stimulation of insulin secretion immediately after exposure to alloxan [43]. This effect can be explained by an initial reduction of ATP consumption resulting from the blockade of glucose phosphorylation by glucokinase [44], which produces a transient increase in ATP in the beta cell and triggers a transient release of insulin.

The inhibition of insulin secretion after exposure to alloxan [43, 45, 46] is restricted to that induced by glucose and its epimer, mannose, both of which induce insulin secretion through interaction with glucokinase [44]. Insulin biosynthesis is also inhibited by alloxan [47, 48], most likely through the same mechanism. The insulin secretory response to other nutrient secretagogues, such as 2-ketoisocaproic acid and leucine, or non-nutrient secretagogues, such as the sulfonyl-urea drug tolbutamide, remains intact initially because it is not mediated via glucokinase [49], but is lost after a delay of up to 1 h [50] as a consequence of the gradual deterioration of beta cell function.

Thiols such as the tripeptide glutathione (GSH), cysteine and dithiothreitol protect glucokinase against alloxan inhibition because they reduce alloxan to dialuric acid, which is not thiol reactive [23, 51, 52]. However, only dithiols such as dithiothreitol [51, 52] can readily reverse alloxan-induced glucokinase inhibition. They achieve this by reducing functionally essential cysteine residues of the glucokinase enzyme [40], which are oxidised through alloxan action [51, 52].

Likewise, glucose protects against alloxan-induced inhibition of glucose-induced insulin secretion because its binding to the sugar-binding site of glucokinase prevents the oxidation of the functionally essential thiol groups. The non-metabolisable seven carbon sugar mannoheptulose protects glucokinase through the same mechanism, but this alone is not sufficient to prevent alloxan-induced inhibition of insulin secretion. The glucose analogue 3-*O*-methylglucose, which is not a substrate of glucokinase, does however prevent inhibition. It does this through competitive blockade of alloxan uptake into the beta cell via the GLUT2 glucose transporter.

Thus, the inhibition of glucose-induced insulin secretion by alloxan is the result of the exquisite thiol reactivity of the glucose sensor glucokinase.

Beta cell toxicity and diabetogenicity of alloxan

Alloxan can generate reactive oxygen species (ROS) in a cyclic reaction with its reduction product, dialuric acid (Fig. 3) [53–56], as depicted in the text box ‘Chemical

Chemical redox cycling reactions between alloxan and dialuric acid, and protective actions of cytoprotective enzymes

- (i) $\text{AH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{AH}^\cdot + \text{O}_2^- + \text{H}^+$
- (ii) $\text{AH}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{O}_2^- + \text{H}^+$
- (iii) $\text{AH}_2 + \text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{AH}^\cdot + \text{H}_2\text{O}_2$
- (iv) $\text{AH}^\cdot + \text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}_2$
- (v) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$
- (vi) $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$
- (vii) $\text{Net: O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow[\text{catalyst}]{\text{metal}} \text{O}_2 + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$
- (viii) $\text{A} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{AH}_2 + \text{GSSG}$
- (ix) $\text{A} + \text{GSH} \rightarrow \text{AH}^\cdot + \text{GS}^\cdot$
- (x) $\text{AH}^\cdot + \text{GSH} \rightarrow \text{AH}_2 + \text{GS}^\cdot$
- (xi) $2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^- \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- (xii) $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
- (xiii) $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{GPx}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$

A, alloxan; $\text{AH}^\cdot$, alloxan radical; AH_2 , dialuric acid; GPx, glutathione peroxidase; $\text{GS}^\cdot$, glutathione radical; GSSG, oxidised glutathione; $\text{OH}^\cdot$, hydroxyl radical; O_2^- , superoxide radical

redox cycling reactions between alloxan and dialuric acid, and protective actions of cytoprotective enzymes’ (reactions i–ii). In the beta cells the toxic action of alloxan is initiated by free radicals formed in this redox reaction [53–57]. Autoxidation of dialuric acid generates superoxide radicals (iii–iv) and hydrogen peroxide (iii–iv), and in the Fenton reaction (v), in the presence of a suitable metal catalyst (typically iron) (vi), hydroxyl radicals (v–vii). The autoxidation of dialuric acid involves the intermediate formation of the alloxan radical (i–iv) [54–56].

The reduction of alloxan to dialuric acid in the cell requires the presence of a suitable thiol, typically the tripeptide glutathione (GSH) to generate the redox cycling partner, dialuric acid, and oxidised glutathione (viii) [56, 58]. The triketone structure of alloxan is vitally important for this two-step reaction with glutathione [59], which generates the alloxan radical as an intermediate product (ix–x). Other thiols such as cysteine, which are present at lower concentrations in the cell, dithiols and ascorbic acid are also suitable reducing agents and may therefore contribute to alloxan reduction [60]. Alloxan can also generate ROS by reacting with thiol groups on proteins such as enzymes [52, 61] and albumin [62]. During each typical redox cycle a small amount of ‘Compound 305’, an alloxan–GSH adduct [23, 32, 56, 63], is formed. The intracellular concentration of Compound 305 increases in a time-dependent manner, which gradually decreases the amount of reduced GSH available in the cell for redox cycling, thus producing a lower pro-oxidative ratio between alloxan and GSH, rather than a higher antioxidant ratio [54–56].

Paradoxically the thiols cysteine and GSH have long been reported to protect rats against the development of alloxan diabetes when injected together with alloxan [64, 65]. This observation can now be explained in light of the established molecular mechanism of alloxan action. When concentrations of reducing agents in the blood stream or in the extracellular space are significantly increased through injection of a thiol, more alloxan is reduced extracellularly so that less is available for intracellular accumulation. Normally the capacity for alloxan reduction, redox cycling and the generation of ROS in the circulation [62] is not sufficient to prevent the alloxan molecule from reaching and entering the beta cell.

The major oxidation pathway of dialuric acid, a chain reaction dependent upon superoxide radicals, is inhibited by superoxide dismutase (SOD; xi). In the presence of SOD, an autocatalytic process involving the interaction between dialuric acid and alloxan becomes important [54], while in the presence of a transition metal, a third oxidation mechanism, dependent upon hydrogen peroxide, has been identified [54]. This latter step is inhibited by the hydrogen peroxide inactivating enzyme catalase [54] (xii; text box:

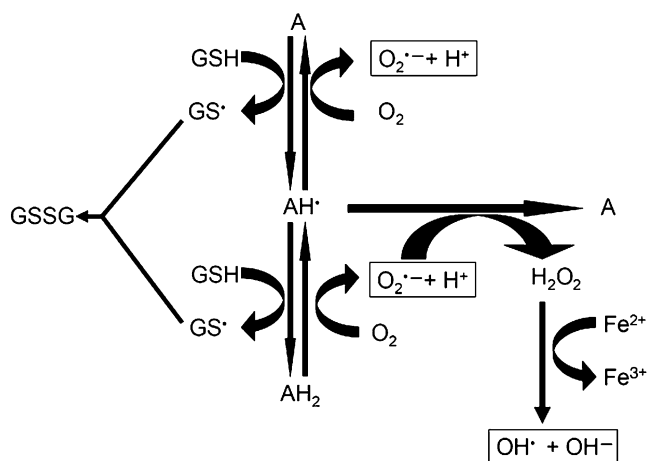


Fig. 3 Redox cycling reactions between alloxan and dialuric acid. A, alloxan; AH•, alloxan radical; AH₂, dialuric acid; GS•, glutathione radical; GSSG, oxidised glutathione; OH•, hydroxyl radical; O₂^{•-}, superoxide radical

Chemical redox cycling reactions between alloxan and dialuric acid, and protective actions of cytoprotective enzymes). The other hydrogen peroxide inactivating enzyme, glutathione peroxidase, can principally act in a similar manner. But this enzyme requires GSH, which is oxidised in this reaction (xiii).

When kept in the oxidised form, alloxan does not generate ROS [60]. Thus, alloxan is not cytotoxic in the absence of thiols such as GSH or when restricted to the extracellular space [60]. Thiols in the plasma membrane, with which alloxan could interact and generate ROS in a redox cycle, are apparently not present or not accessible to a sufficient extent to allow the generation of ROS and damage the cells [60].

The reduction product dialuric acid is also not toxic when kept in the reduced form [54, 56, 60]. However, in contrast to alloxan, dialuric acid autoxidises spontaneously in the presence of O₂, thus generating cytotoxic ROS in the absence of thiols [54, 55]. As a result of subsequent redox cycling it can also induce diabetes [10, 11] and cause beta cell lesions as alloxan [6].

The antioxidative enzyme SOD has a cytoprotective effect against both alloxan and dialuric acid in the presence of GSH by virtue of its ability to scavenge superoxide radicals, which are generated in the O₂-dependent chain reaction between dialuric acid and alloxan. The resultant suppression of dialuric acid autoxidation prevents the generation of further ROS [54, 56], although increasing the concentrations of the toxins can reinstate the toxic action of both compounds. This is due to an autocatalytic reaction between the oxidised and reduced pyrimidine, which generates ROS even when the chain reaction is suppressed by SOD [54, 56].

Apparently, the superoxide radical is not the species responsible for the cytotoxicity of alloxan and dialuric acid.

Several lines of evidence point to hydroxyl radicals as the principal culprit.

First, the hydrogen peroxide-inactivating enzyme catalase provides significantly better protection against the toxic effects of alloxan and dialuric acid on insulin-producing cells than the superoxide radical-inactivating enzyme SOD, though catalase does not prevent redox cycling and therefore superoxide radical formation [54, 56].

Second, since intracellular GSH concentrations are in the same millimolar concentration range in insulin-producing cells as in liver cells, and since both cell types express the GLUT2 glucose transporter, a difference in the intracellular GSH concentration cannot be responsible for the much greater susceptibility in vivo of insulin-producing cells compared with liver cells to the toxicity of alloxan [17]. However, liver cells are much better endowed with the hydrogen peroxide-inactivating enzyme catalase compared with insulin-producing cells [66, 67]. When the low intracellular levels of catalase are raised in insulin-producing cells through overexpression of the gene for this enzyme, these cells are protected equally well [60].

Third, a multitude of metal chelators, iron chelators in particular, and hydroxyl scavengers have been tested for their protective action both in vitro and in vivo, but the results obtained have not been unequivocal [18, 22, 66, 68–70]. Given the extremely short half-life and the extraordinary chemical reactivity of the hydroxyl radical, it is not surprising that complete protection against alloxan toxicity cannot be achieved. Hydroxyl radicals interact with biological targets before they can be inactivated through hydroxyl radical scavengers. In the same way, it is not surprising that it has been extremely difficult to efficiently suppress metal-catalysed hydroxyl radical formation through chelators [69–72], since it is crucial that metal chelation occurs before hydroxyl radical formation is initiated. Owing to the chemical properties of the scavengers and chelators, this cannot be completely achieved unless experimental conditions are optimised. In such a setting the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells in vitro is suppressed by the iron chelator desferrioxamine [60], which prevents the generation of the very toxic hydroxyl radicals in the iron-catalysed Fenton reaction [54, 56] (Fig. 3).

Taken together, these data provide convincing evidence that the hydroxyl radical [56, 60, 73], rather than the superoxide radical, is the ultimate toxic ROS species, and that its formation is prevented by the destruction of hydrogen peroxide by catalase [54, 56].

Optimal protection against the cytotoxic action of alloxan and dialuric acid is provided only by a combination of SOD plus catalase, which completely prevents redox cycling between alloxan and dialuric acid, and thus the generation of all ROS species in this reaction pathway.

Glucose also provides complete protection against all toxic effects of alloxan both in vivo and in vitro [2]. This universal protection is achieved through the prevention of glucokinase inhibition and the preservation of the antioxidative defence mechanisms of the beta cell [22]. The non-metabolisable glucose analogue 3-*O*-methylglucose also provides protection, but does this exclusively through the prevention of alloxan uptake into the beta cell via the GLUT2 glucose transporter [22].

Thus, it can be concluded that the pancreatic beta cell toxicity and the resultant diabetogenicity of alloxan are due to redox cycling and the generation of toxic ROS.

Streptozotocin: mechanism of action

Streptozotocin (Fig. 2) inhibits insulin secretion and causes a state of insulin-dependent diabetes mellitus. Both effects can be attributed to its specific chemical properties, namely its alkylating potency (see text box: Comparison of the chemical properties of alloxan and streptozotocin). As with alloxan, its beta cell specificity is mainly the result of selective cellular uptake and accumulation.

Beta cell selectivity of streptozotocin

Streptozotocin is a nitrosourea analogue in which the *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) moiety (Fig. 2) is linked to the carbon-2 of a hexose. The toxic action of streptozotocin and chemically related alkylating compounds requires their uptake into the cells. Nitrosoureas are usually lipophilic and tissue uptake through the plasma membrane is rapid; however, as a result of the hexose substitution, streptozotocin is less lipophilic. Streptozotocin is selectively accumulated in pancreatic beta cells via the low-affinity GLUT2 glucose transporter in the plasma membrane [74, 75]. Thus, insulin-producing cells that do not express this glucose transporter are resistant to streptozotocin [76–78]. This observation also explains the greater toxicity of streptozotocin compared with *N*-methyl-*N*-nitrosourea in cells that express GLUT2, even though both substances alkylate DNA to a similar extent [77, 79, 80]. The importance of the GLUT2 glucose transporter in this process is also shown by the observation that streptozotocin damages other organs expressing this transporter, particularly kidney and liver [17, 19].

Beta cell toxicity of streptozotocin

It is generally assumed that the toxicity of streptozotocin is dependent upon the DNA alkylating activity of its methylni-

trosoarea moiety [79–83], especially at the O⁶ position of guanine [22]. The transfer of the methyl group from streptozotocin to the DNA molecule causes damage, which along a defined chain of events [84], results in the fragmentation of the DNA [85]. Protein glycosylation may be an additional damaging factor [41]. In the attempt to repair DNA, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is overstimulated. This diminishes cellular NAD⁺, and subsequently ATP, stores [82, 85–87]. The depletion of the cellular energy stores ultimately results in beta cell necrosis. Although streptozotocin also methylates proteins [80, 81], DNA methylation is ultimately responsible for beta cell death, but it is likely that protein methylation contributes to the functional defects of the beta cells after exposure to streptozotocin.

Inhibitors of poly ADP-ribosylation suppress the process of DNA methylation. Thus, injection of nicotinamide and other PARP inhibitors in parallel with, or prior to the administration of streptozotocin is well known to protect beta cells against the toxic action of streptozotocin and to prevent the development of a diabetic state [13]. Also, mice deficient in PARP are resistant to beta cell death mediated by streptozotocin, in spite of DNA fragmentation. The absence of PARP prevents the depletion of the cofactor NAD⁺ and the subsequent loss of ATP [84, 88–90] and thus cell death.

The role of alkylation in beta cell damage has also been examined by the use of ethylating agents, which are less toxic than their methylating counterparts, on account of O⁶-ethylguanine being less toxic than O⁶-methylguanine [91]. The fact that *N*-ethyl-*N*-nitrosourea and ethyl methane-sulphonate are significantly less toxic to insulin-producing

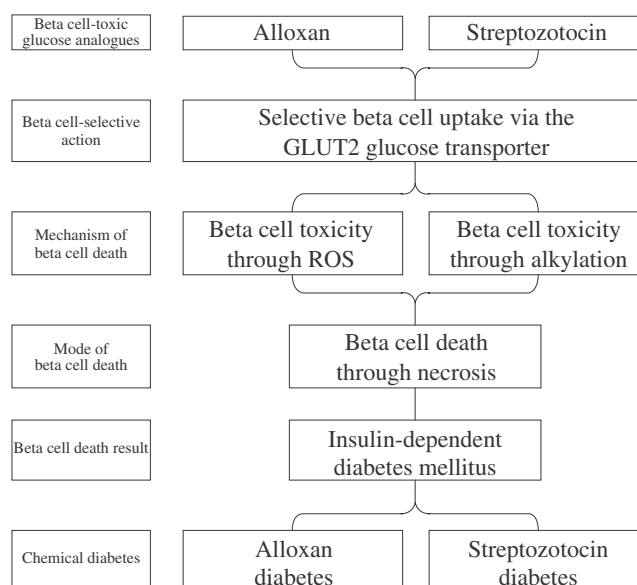


Fig. 4 Schematic representation of the toxic effects of the glucose analogues alloxan and streptozotocin in beta cells, which produce chemical diabetes

cells than MNU and methyl methanesulphonate [77, 91] has been taken as support for the notion that in insulin-producing cells, as in other cell types, the mechanism of toxic action is due to alkylation, with methylation of DNA bases being more toxic than ethylation [22, 81].

An alternative hypothesis proposes that part of the diabetogenic effect of streptozotocin may relate not to its alkylating ability but to its potential to act as an intracellular nitric oxide (NO) donor [92]. Both streptozotocin and MNU contain a nitroso group (Fig. 2) and can liberate NO. In fact, streptozotocin has been shown to increase the activity of guanylyl cyclase and the formation of cGMP, which are characteristic effects of NO. However, the alkylating agent methyl methanesulphonate is the most toxic compound, though unlike MNU, it is not a NO donor [91], indicating that NO is not an indispensable prerequisite for the toxic action of the family of alkylating agents that streptozotocin belongs to.

Finally, some minor generation of ROS, including superoxide and hydroxyl radicals originating from hydrogen peroxide dismutation during hypoxanthine metabolism [93], may accompany the effect of streptozotocin and accelerate the process of beta cell destruction but ROS do not play a crucial role [22].

Inhibition of insulin secretion by streptozotocin

The effects of streptozotocin on glucose and insulin homeostasis reflect the toxin-induced abnormalities in beta cell function. Initially, insulin biosynthesis, glucose-induced insulin secretion and glucose metabolism (both glucose oxidation and oxygen consumption) are all affected [93–95]. On the other hand, streptozotocin has no immediate, direct inhibitory effect upon glucose transport [77] or upon glucose phosphorylation by glucokinase [39]. However, at later stages of functional beta cell impairment, deficiencies in terms of gene expression and protein production lead to the deterioration of both glucose transport and metabolism [96].

Even before the negative effects of mitochondrial DNA and protein alkylation and glycosylation become evident, streptozotocin-induced depletion of NAD⁺ may result in the inhibition of insulin biosynthesis and secretion [82, 85, 94]. Later, inhibition of glucose-induced and amino acid-induced insulin secretion [97] as a result of mitochondrial enzyme dysfunction [98] and damage to the mitochondrial genome [99] become apparent. This impairment is more marked for nutrient- than for non-nutrient-induced insulin secretion. This interpretation has been confirmed through studies which have shown that pre-treatment of isolated pancreatic islets with the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor nicotinamide prevents early inhibition of beta cell function during the first day after streptozotocin

exposure, while long-term inhibition of insulin secretion 6 days after streptozotocin exposure was not counteracted by nicotinamide [100].

Conclusion

Both alloxan and streptozotocin induce insulin deficiency. While the mechanisms of beta cell-selective action through uptake via the GLUT2 glucose transporter and beta cell death via necrosis are identical, ROS in the case of alloxan and DNA alkylation in the case of streptozotocin mediate the toxic action of these glucose analogues (Fig. 4). This also explains why a lack of significant expression of this glucose transporter isoform, such as in human beta cells, provides insensitivity to the toxins [22, 101]. On the other hand, expression of this glucose transporter in other organs like in tubular cells and hepatocytes explains why the toxins can cause damage to kidney and liver [22].

Due to its chemical properties, in particular the greater stability (see text box: Comparison of the chemical properties of alloxan and streptozotocin), streptozotocin is the agent of choice for reproducible induction of a diabetic metabolic state in experimental animals. Alloxan, on the other hand, as a model compound of ROS mediated beta cell toxicity, is the agent with the greater impact upon the understanding of ROS mediated mechanisms of beta cell death in type 1 and type 2 diabetes mellitus.

Acknowledgements The author is most grateful to Frits Holleman for excellent editorial support.

Duality of interest The author states no duality of interest.

References

1. Wöhler F, Liebig J (1838) Untersuchungen über die Natur der Harnsäure. [Investigations on the nature of uric acid]. *Ann Pharm* 26:241–340 (article in German)
2. Lenzen S, Panten U (1988) Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 31:337–342
3. Lenzen S, Tiedge M, Jörns A, Munday R (1996) Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In: Shafrir E (ed) *Lessons from animal diabetes*. Birkhäuser, Boston, pp 113–122
4. Dunn JS, McLetchie NGB (1943) Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet* 245:384–387
5. Dunn JS, Sheehan HL, McLetchie NGB (1943) Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* 244:484–487
6. Jörns A, Munday R, Tiedge M, Lenzen S (1997) Comparative toxicity of alloxan, *N*-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J Endocrinol* 155:283–293
7. Peschke E, Ebel H, Brömme HJ, Peschke D (2000) ‘Classical’ and ‘new’ diabetogens—comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. *Cell Mol Life Sci* 57:158–164

8. Goldner MG, Gomori G (1943) Alloxan diabetes in the dog. *Endocrinology* 33:297–308
9. McLetchie NGB (1982) Alloxan diabetes: the sorcerer and his apprentice. *Diabetologia* 23:72–75
10. Bailey CC, Bailey OT, Leech RS (1946) Diabetes mellitus in rabbits injected with dialuric acid. *Proc Soc Exp Biol Med* 63:502–505
11. Brückmann G, Wertheimer E (1947) Alloxan studies: the action of alloxan homologues and related compounds. *J Biol Chem* 168:241–256
12. White FR (1963) Streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* 30:49–53
13. Schein PS, Cooney DA, Vernon ML (1967) The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res* 27:2324–2332
14. Schein PS, O'Connell MJ, Blom J et al (1974) Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin (NSC-85998). *Cancer* 34:993–1000
15. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 29:91–98
16. Arison RN, Ciaccio EI, Glitzer MS, Cassaro JA, Pruss MP (1967) Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes* 16:51–56
17. Rerup CC (1970) Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 22:485–518
18. Cooperstein SJ, Watkins D (1981) Action of toxic drugs on islet cells. In: Cooperstein SJ, Watkins D (eds) *The islet of Langerhans*. Academic, New York, pp 387–425
19. Weiss RB (1982) Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep* 66:427–438
20. Preston AM (1985) Modification of streptozotocin-induced diabetes by protective agents. *Nutr Res* 5:435–446
21. Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537–546
22. Lenzen S (2007) Alloxan and streptozotocin diabetes. In: Peschke E (ed) *Endokrinologie III Vorträge im Rahmen des Projektes 'Zeitstrukturen endokriner Systeme'*. [Endocrinology III lectures within the 'time structures of endocrine systems' project framework]. Abhandlung der Sächs. Akad. Wiss., Math-naturwiss Klasse, Verlag der Sächsischen Akademie der Wissenschaften, Leipzig, commissioned by S. Hirzel Verlag, Stuttgart/Leipzig, pp 119–138
23. Lenzen S, Munday R (1991) Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* 42:1385–1391
24. Weaver DC, Barry CD, McDaniel ML, Marshall GR, Lacy PE (1979) Molecular requirements for recognition at glucoreceptor for insulin release. *Mol Pharmacol* 16:361–368
25. Gorus FK, Malaisse WJ, Pipeleers DG (1982) Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem J* 208:513–515
26. Weaver DC, McDaniel ML, Lacy PE (1978) Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans. *Endocrinology* 102:1847–1855
27. Elsner M, Tiedge M, Guldbakke B, Munday R, Lenzen S (2002) Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia* 45:1542–1549
28. Hammarström L, Hellman B, Ullberg S (1967) On the accumulation of alloxan in the pancreatic beta-cells. *Diabetologia* 3:340–344
29. Boquist L, Nelson L, Lorentzon R (1983) Uptake of labeled alloxan in mouse organs and mitochondria in vivo and in vitro. *Endocrinology* 113:943–948
30. Malaisse WJ, Doherty M, Ladiere L, Malaisse-Lagae F (2001) Pancreatic uptake of [2-¹⁴C]alloxan. *Int J Mol Med* 7:311–315
31. Bloch KO, Zemel R, Bloch OV, Grief H, Vardi P (2000) Streptozotocin and alloxan-based selection improves toxin resistance of insulin-producing RINm cells. *Int J Exp Diabetes Res* 1:211–219
32. Patterson JW, Lazarow A, Levey S (1949) Alloxan and dialuric acid: their stabilities and ultraviolet absorption spectra. *J Biol Chem* 177:187–196
33. Gomori G, Goldner MG (1945) Acute nature of alloxan damage. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 58:232–233
34. Bailey CC, Collins-Williams J, Le Compte PM (1950) Effect of alloxan in rabbits with temporary occlusion of the arteries to the pancreas. *Proc Soc Exp Biol* 71:580–583
35. Hellman B, Diderholm H (1955) The diabetogenic effect of alloxan after elimination of extra-pancreatic factors. *Acta Endocrinol (Copenh)* 20:81–87
36. Munday R, Ludwig K, Lenzen S (1993) The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J Endocrinol* 139:153–163
37. Hara H, Miwa I, Okuda J (1986) Inhibition of rat liver glucokinase by alloxan and ninhydrin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 34:4731–4737
38. Meglasson MD, Burch PT, Berner DK, Najafi H, Matschinsky FM (1986) Identification of glucokinase as an alloxan-sensitive glucose sensor of the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 35:1163–1173
39. Lenzen S, Tiedge M, Panten U (1987) Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115:21–29
40. Tiedge M, Richter T, Lenzen S (2000) Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Arch Biochem Biophys* 375:251–260
41. Konrad RJ, Kudlow JE (2002) The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int J Mol Med* 10:535–539
42. Gunnarsson R, Hellerström C (1973) Acute effects of alloxan on the metabolism and insulin secretion of the pancreatic B-cell. *Horm Metab Res* 5:404–409
43. Weaver DC, McDaniel ML, Naber SP, Barry CD, Lacy PE (1978) Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 27:1205–1214
44. Lenzen S, Panten U (1988) Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol* 37:371–378
45. Ishibashi F, Onari K, Sato T, Kawate R (1978) Studies on the mechanism of alloxan inhibition of glucose-induced insulin release. *Hiroshima J Med Sci* 27:211–219
46. Miwa I, Hara H, Okuda J (1986) Parallel inhibition of islet glucokinase and glucose-stimulated insulin secretion by either alloxan or ninhydrin. *J Clin Biochem Nutr* 1:237–245
47. Jain K, Logothetopoulos J (1976) Proinsulin biosynthesis by pancreatic islets of the rat and the study of alloxan cytotoxicity in vitro. *Biochim Biophys Acta* 435:145–151
48. Niki A, Niki H, Miwa I, Lin BJ (1976) Interaction of alloxan and anomers of d-glucose on glucose-induced insulin secretion and biosynthesis in vitro. *Diabetes* 25:574–579
49. Lenzen S, Brand FH, Panten U (1988) Structural requirements of alloxan and ninhydrin for glucokinase inhibition and of glucose for protection against inhibition. *Br J Pharmacol* 95:851–859
50. Borg LA (1981) Effects of alloxan on the islets of Langerhans: inhibition of leucine metabolism and insulin secretion. *Biochim Biophys Acta* 677:257–262
51. Lenzen S, Freytag S, Panten U (1988) Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol Pharmacol* 34:395–400
52. Lenzen S, Mirzaie-Petri M (1991) Inhibition of glucokinase and hexokinase from pancreatic B-cells and liver by alloxan, alloxantin, dialuric acid, and *t*-butylhydroperoxide. *Biomed Res* 12:297–307
53. Cohen G, Heikkilä RE (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 249:2447–2452

54. Munday R (1988) Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of 'active oxygen' species. *Biochem Pharmacol* 37:409–413
55. Winterbourn CC, Cowden WB, Sutton HC (1989) Auto-oxidation of dialuric acid, divicine and isouramil. Superoxide dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol* 38:611–618
56. Winterbourn CC, Munday R (1989) Glutathione-mediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed $OH^\bullet$ formation. *Biochem Pharmacol* 38:271–277
57. Oberley LW (1988) Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 5:113–124
58. Brömme HJ, Mörke W, Peschke D, Ebel H (2000) Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J Pineal Res* 29:201–208
59. Elsner M, Gurgul-Convey E, Lenzen S (2007) Relation between triketone structure, generation of reactive oxygen species and selective toxicity of the diabetogenic agent alloxan. *Antioxid Redox Signal* (in press)
60. Elsner M, Gurgul-Convey E, Lenzen S (2006) Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med* 41:825–834
61. Lenzen S, Mirzaie-Petri M (1992) Inhibition of aconitase by alloxan and the differential modes of protection of glucose, 3-O-methylglucose, and mannoheptulose. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 346:532–536
62. Sakurai K, Miura T (1989) Generation of free radicals by alloxan in the presence of bovine serum albumin: a role of protein sulfhydryl groups in alloxan cytotoxicity. *Biochem Int* 19:405–412
63. Brömme HJ, Mörke W, Weinandy R, Peschke D, Peschke E (2002) Formation of compound 305 requires the simultaneous generation of both alloxan and GSH radicals. *Horm Metab Res* 34:62–66
64. Lazarow A, Patterson JW, Levey S (1948) The mechanism of cysteine and glutathione protection against alloxan diabetes. *Science* 108:308–309
65. Sen PB, Bhattacharya G (1952) Reversal of the diabetogenic action of alloxan by sulfhydryl compounds. *Science* 115:41–43
66. Grankvist K, Marklund S, Sehlin J, Täljedal IB (1979) Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochem J* 182:17–25
67. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733–1742
68. Tibaldi J, Benjamin J, Cabbat FS, Heikkilä RE (1979) Protection against alloxan-induced diabetes by various urea derivatives: relationship between protective effects and reactivity with the hydroxyl radical. *J Pharmacol Exp Ther* 211:415–418
69. Fischer LJ, Harman AW (1982) Oxygen free radicals and the diabetogenic action of alloxan. In: Autor AP (ed) *Pathology of oxygen*. Academic, New York, pp 261–275
70. Jörns A, Tiedge M, Lenzen S, Munday R (1999) Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro. *Free Radic Biol Med* 26:1300–1304
71. Grankvist K, Marklund S, Täljedal IB (1979) Influence of trace metals on alloxan cytotoxicity in pancreatic islets. *FEBS Lett* 105:15–18
72. Heikkilä RE, Cabbat FS (1982) The prevention of alloxan-induced diabetes in mice by the iron-chelator detapac: suggestion of a role for iron in the cytotoxic process. *Experientia* 38:378–379
73. Heikkilä RE, Winston B, Cohen G (1976) Alloxan-induced diabetes-evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. *Biochem Pharmacol* 25:1085–1092
74. Tjälve H, Wilander E, Johansson EB (1976) Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol* 69:455–456
75. Karunanayake EH, Baker JR, Christian RA, Hearse DJ, Mellows G (1976) Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (^{14}C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia* 12:123–128
76. Ledoux SP, Wilson GL (1984) Effects of streptozotocin on a clonal isolate of rat insulinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 804:387–392
77. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S (2000) Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43:1528–1533
78. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43:1326–1333
79. Ledoux SP, Woodley SE, Patton NJ, Wilson GL (1986) Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA. *Diabetes* 35:866–872
80. Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, LeDoux SP (1988) Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes* 37:213–216
81. Bennett RA, Pegg AE (1981) Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res* 41:2786–2790
82. Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H (1982) Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem* 257:6084–6088
83. Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S (1999) Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol* 57:881–887
84. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH (1999) Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 20:171–181
85. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H (1981) Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294:284–286
86. Schein PS, Loftus S (1968) Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res* 28:1501–1506
87. Sandler S, Swenne I (1983) Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 25:444–447
88. Pieper AA, Brat DJ, Krug DK et al (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3059–3064
89. Burkart V, Wang ZQ, Radons J et al (1999) Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozotocin. *Nat Med* 5:314–319
90. Masutani M, Suzuki H, Kamada N et al (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2301–2304
91. Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC (1995) Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O^6 -alkylating ability. *Biochem Pharmacol* 50:2015–2020
92. Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML (1993) Biochemical evidence for nitric oxide formation from

- streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1458–1464
93. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J (1990) Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn* 13:259–262
 94. Strandell E, Eizirik DL, Korsgren O, Sandler S (1988) Functional characteristics of cultured mouse pancreatic islets following exposure to different streptozotocin concentrations. *Mol Cell Endocrinol* 59:83–91
 95. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M (1996) *N*-Monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 52:344–347
 96. Wang Z, Gleichmann H (1998) GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47:50–56
 97. Eizirik DL, Sandler S, Sener A, Malaisse WJ (1988) Defective catabolism of d-glucose and l-glutamine in mouse pancreatic islets maintained in culture after streptozotocin exposure. *Endocrinology* 123:1001–1007
 98. Rasschaert J, Eizirik DL, Malaisse WJ (1992) Long term in vitro effects of streptozotocin, interleukin-1, and high glucose concentration on the activity of mitochondrial dehydrogenases and the secretion of insulin in pancreatic islets. *Endocrinology* 130:3522–3528
 99. Eizirik DL, Sandler S, Ahnström G, Welsh M (1991) Exposure of pancreatic islets to different alkylating agents decreases mitochondrial DNA content but only streptozotocin induces long-lasting functional impairment of B-cells. *Biochem Pharmacol* 42:2275–2282
 100. Strandell E, Eizirik DL, Sandler S (1989) Survival and B-cell function of mouse pancreatic islets maintained in culture after concomitant exposure to streptozotocin and nicotinamide. *Exp Clin Endocrinol* 93:219–224
 101. Elsner M, Tiedge M, Lenzen S (2003) Mechanism underlying resistance of human pancreatic beta cells against toxicity of streptozotocin and alloxan. *Diabetologia* 46:1713–1714

Laboratory

Animals

Guía para el Punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos

Informe del Grupo de Trabajo sobre el Punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos

Edición en Español de:
Laboratory Animals (2005) **8**, 5-12

Editado por:



Publicación patrocinada por:



Traducción del siguiente artículo original publicado en Laboratory Animals:

Humane endpoints in animal experimentatiton for biomedical research: ethical, legal and practical aspects

Members of the Rodent Refinement Working Party: M. Jennings
(Secretary), G. R. Batchelor, P. F. Brain, A. Dick, H. Elliott, R. J. Francis,
R. C. Hubrecht, J. L. Hurst, D. B. Morton, A. G. Peters, R. Raymond,
G. D. Sales, C. M. Sherwin & C. West

Laboratory Animals (2005) **8**, 5-12

Este artículo ha sido revisado por

Dr. José M.^a Orellana Muriana. Universidad de Alcalá (Madrid). España

Traducción: Águeda M.^a Orellana Solares

Coordinación: Dr. José M.^a Orellana Muriana. Universidad de Alcalá. Madrid
Dr. Antonio Martínez Escandell. GSK. Madrid

Nuestro agradecimiento al Consejo de Dirección de *Laboratory Animals Ltd.* por el patrocinio
y colaboración en esta traducción.

Punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos

David B. Morton

Centre for Biomedical Ethics, División of Primary Care, Public and Occupational Health, School of Medicine, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2 TT, UK (e-mail: d.b.morton@bham.ac.uk)

Resumen

Este artículo expone y comenta las razones por las que se debe llevar a cabo el punto final humanitario (*humane end-point*): Cuando los resultados científicos ya no serán útiles por más que se continúe con el experimento; cuando hay una falta de proporcionalidad entre el sufrimiento del animal y el beneficio obtenido; cuando el sufrimiento del animal ha excedido los límites humanitarios independientemente del beneficio obtenido; y, finalmente, cuando puede emplearse un sustitutivo del punto final. Se adjunta un esquema para el reconocimiento y evaluación de los signos clínicos y su correcta utilización en el punto final y se dan algunos ejemplos.

Durante esta charla, serán recurrentes los aspectos éticos, legales y prácticos del refinamiento en la experimentación animal. En particular, con referencia al desarrollo y la implementación del momento de punto final. Querría añadir así mismo a esta lista, los aspectos científicos, ya que a veces el punto final gira alrededor de la validez científica de un procedimiento específico. Hablaré de forma muy general de los cuatro aspectos que acabo de mencionar, explicando más a fondo la utilización de las hojas de valoración para el reconocimiento y evaluación de los efectos de un experimento sobre el animal y la utilización de otras hojas de valoración para la implementación de los límites de severidad del experimento y del punto final.

Aspectos éticos

Uno de los argumentos éticos que apuntala la experimentación animal es si debemos utilizar animales y, si es así, con qué propósito. En el Reino Unido está prohibida la utilización de animales para testar cosméticos o sus compuestos, pero normalmente se justifica la utilización de animales con fines médicos. En cualquier caso, el sufrimiento animal debería ser reducido al mínimo, ateniéndose al objetivo

científico y ético de las Tres Erres postuladas por Rusell y Burch (1959). Más allá del reemplazamiento o la reducción, será el refinamiento del que más se trate en esta conferencia. El refinamiento en experimentación ha sido definido como: "Aquellos métodos que evitan, alivian o minimizan el dolor potencial, angustia u otros efectos adversos sufridos por los animales implicados, o mejoran el bienestar animal" (Morton 1998a).

Categorías del punto final y aspectos científicos

Muchos de los procedimientos de experimentación animal causan sufrimiento a los animales (incluso su estabulación debería ser a veces tenida en cuenta) y, como toda clase de sufrimiento podría describirse como inhumana, el punto final podría quizá considerarse como "lo menos inhumano" (ver Balls 1999). Otra forma de plantearlo es a través de que el sufrimiento es "evitable" y, yendo más allá, si un objetivo científico necesita del sufrimiento, éste podría describirse como inhumano y por tanto como innecesario. Uno puede identificar cinco tipos de punto final, estando los dos primeros relacionados con aspectos científicos.

El primer tipo es cuando el animal no va a proporcionar más información científica útil por estar muy afectado fisiológicamente; lo cual puede estar relacionado, pero no siempre, con la variable que está siendo estudiada (ej. Un animal puede desarrollar una diarrea aguda y no remitente durante el curso de unas pruebas y por ello convertirse en metabólicamente inestable; otro ejemplo puede ser una infección que aparece al mismo tiempo que otra, también llamada concomitante).

Un segundo tipo es cuando el animal no va a proporcionar información científicamente útil, porque está psicológicamente perturbado. A veces está relacionado, pero no siempre, con la variable que está siendo estudiada (ej. Un animal al que es difícil administrarle y presenta una angustia, hasta el punto que afecta su estado mental y por lo tanto su estado metabólico. Sabemos que el sistema nervioso central (SNC) afecta directamente a la función inmune y que el sistema de estabulación puede afectar a los neurorreceptores del SNC (Wadham 1996).

Un tercer tipo de punto final es cuando el sufrimiento causado a los animales durante el estudio es más alto de lo previsto y la proporcionalidad entre el coste / beneficio se pierde, por lo que el daño realizado al animal pesa más que el beneficio que está siendo buscado.

Cuarto, cuando el nivel de sufrimiento es tan alto, es simplemente un error causar este grado de daño al animal. En la legislación del Reino Unido y las guías de la OCDE esto sería denominado "daño severo y angustia severa".

Quinto, cuando un alto grado de sufrimiento puede estar justificado, pero no hay necesidad de causarlo ya que puede predecirse el punto final científico de modo previo, a un nivel pre-lethal o de pre-dolor. He llamado a este tipo "punto final sustitutivo" (Cussler *et al.* 1999, Hendriksen *et al.* 1999). Por ejemplo, detectar ciertos niveles de glucosa en sangre es mejor que esperar la muerte del animal en estudios de terapia por trasplante en diabéticos, o bien concluir una prueba de categorización de sustancias (test) tan pronto como se obtenga el primer positivo, si ello permite determinar la sustancia, incluso aunque el resto de los animales dieran negativo. En este último tipo es imprescindible un correcto diseño experimental (Morton 1998c, Fry 1999).

Mientras que la reducción del número de animales utilizados en la investigación está en consideración, la mayoría de culturas pone poco

énfasis en el valor de la vida de un solo animal y por eso hay menos controles sobre los animales sacrificados que sobre los métodos de sacrificio (ver Hansen *et al.* 1999). Deberíamos parar un momento y recapacitar acerca del debate existente sobre qué hacer con los más de 1800 chimpancés en cautividad que existen y por el contrario, la ausencia de debate sobre la muerte de otros tipos de primates. No estoy tan convencido de que quitar la vida a un mamífero no sea un daño moral como otros han defendido (DeGrazia 1996) pero, en ningún caso, yo la colocaría en el tercer lugar de las Tres erres. No debe olvidarse que el modo en que alojamos los animales puede también causarles sufrimiento e incomodidad. El sufrimiento mental en la estabulación es otro área muy importante dentro del refinamiento.

Aspectos legales

Hasta donde yo sé, todas las leyes nacionales e internacionales, así como las guías internacionales incorporan el concepto de las Tres erres.

El articulado de las leyes trata de: utilizar siempre métodos alternativos no sensitivos cuando se disponga de ellos; realizar investigaciones bajo anestesia siempre que sea posible; utilizar las especies menos sensitivas en la escala filogenética; proporcionar la analgesia adecuada, por ejemplo después de la cirugía; obtener asesoramiento profesional de los veterinarios y otras personas competentes cuando sea necesario; asegurar una formación y una competencia por parte de todo el personal; proporcionar la estabulación de las especies animales con fines de cría, stock o experimentación en adecuadas condiciones ambientales; minimizar el dolor y el sufrimiento y reducir el número de animales al mínimo necesario; dar una adecuada justificación de la investigación en primera instancia; y, si se va a causar sufrimiento al animal, que éste pueda ser aliviado, a menos que el objetivo científico prohíba tal alivio, en cuyo caso este sufrimiento requerirá de una exhaustiva justificación.

Aspectos prácticos

Son los aspectos prácticos del refinamiento de los experimentos con animales, cuando pueden producir dolor, angustia (stress bajo el cual un animal fracasa en hacerle frente, Morton 1995a, 1998a), sufrimiento mental,

incomodidad o daño duradero. Antes de que estos estados puedan ser aliviados o detectados, o antes de que los experimentos sean refinados para causar menos dolor y sufrimiento, tenemos que ser capaces de haber reconocido en qué momento el bienestar animal se está viendo comprometido, tanto positiva como negativamente. Más aún, sería importante eliminar cualquier sufrimiento del animal para conseguir una ciencia de calidad y, en relación con la cuestión que está siendo formulada, lograr la mejor práctica científica al mínimo coste económico (Claassen 1994, Balls *et al.* 1995, Morton 1998b).

Una forma de enfrentarse a este problema es utilizando una serie de signos clínicos (hojas de valoración), (Morton 1990, Morton y Townsend 1995, Morton 1995b, 1997a,b) como modo para determinar el grado en el cual el estado mental y fisiológico de un animal se ha desviado de lo normal y, de ese modo, utilizarlos para evaluar el grado de severidad del experimento. Las hojas de valoración tienen que ser redactadas específicamente para cada procedimiento y para cada especie e, incluso a veces, para cada cepa a la que se le realiza el procedimiento, ya que raramente pueden generalizarse. Estas hojas especifican los principales signos clínicos que pueden observarse y cuantificarse. Las hojas han ido siendo mejoradas gracias a la experiencia de un equipo de observadores (Morton *et al.* 1990). Debe formarse un equipo en el que los cuidadores deben tener un papel primordial, ya que probablemente son los que mejor saben cuando un animal no se encuentra bien. Por ejemplo, al observar un cambio de comportamiento, o postural, de apariencia o incluso en el sentimiento u olor del animal. La opinión del veterinario debe ayudar a la identificación de forma objetiva de los signos clínicos, así como aportando su conocimiento sobre la biología de las especies, a la hora de indicar el abanico de respuestas fisiológicas y de comportamiento posibles. Por último el investigador debe ser un experto en las consecuencias que pueden tener estas perturbaciones en la investigación. Todos estos factores servirán como guías para la evaluación de los efectos del procedimiento sobre el animal. Mediante la pormenorización de los principales signos en cualquier protocolo y una observación regular de los animales en los periodos críticos del experimento, podrá

hacerse una evaluación objetiva del bienestar animal a todo lo largo del experimento.

Se establecieron unas listas con los signos clínicos obtenidos tras la observación de algunos animales durante un procedimiento. Estas listas fueron después modificadas gracias a la experiencia adquirida, hasta conseguir el conjunto de los signos más característicos que la mayoría de animales muestran durante los experimentos y que sirven para la evaluación del sufrimiento. Estos signos se anotan cronológicamente en las hojas de valoración (ver ejemplo en la tabla 1). Los signos clínicos deben registrarse de un modo tan escueto, que simplemente se indique si están presentes o ausentes mediante un signo positivo o negativo (o con el signo +/- si el observador no está seguro) y así reducir al máximo una interpretación subjetiva del observador. Existe un acuerdo para que los signos negativos indiquen normalidad y los signos positivos indiquen que el animal está fuera de un rango normal. De este modo, es posible obtener con un simple vistazo de la hoja una idea general del estado de bienestar del animal: una mayoría de signos positivos en la hoja indicaría que el animal se ha desviado de lo normal y que está sufriendo más que antes. En la práctica, es importante desarrollar un método muy estructurado que permita reconocer los efectos adversos en los animales. Al principio de la evaluación, el animal debe ser observado a distancia para apreciar su comportamiento y apariencia de forma natural. A continuación, cuando el observador se aproxime al corral o retire la tapa de la jaula, el animal empezará inevitablemente a interactuar con el observador y su respuesta podrá ser evaluada dentro de lo normal, aunque ésta pueda ser agresiva, temerosa, o con la emisión de sonidos guturales. Finalmente, puede llevarse a cabo un examen clínico detallado mediante la sujeción y manipulación del animal, observando cuidadosamente su apariencia, así como tomando algunas mediciones clínicas, como por ejemplo, el peso corporal o su temperatura, lo cual podrá ser añadido al comportamiento.

En el pie de la hoja aparecen anotaciones dirigidas a los cuidadores y los veterinarios, sobre lo que deben proporcionar a los animales durante un procedimiento científico, en términos de estabulación y cuidados. Hay además instrucciones sobre cómo tomar nota de los signos clínicos cualitativos (como por

Tabla 1. Hoja de valoración para trasplante cardíaco heterotópico. Licencia N° 1234. Rata

Rata N° IR2	Ejemplar N° 5390					
Fecha de operación: 27/1/96	> Peso preoperatorio: 300 g					
Fecha	27 Ene	28 Ene	28 Ene	28 Ene	29 Ene	29 Ene
Día	0	1	1	1	2	2
Hora	16:30	8:30	12:00	16:30	8:30	11:00
A distancia						
No activo	-	-	-	-	-	+
Si inactivo - respuesta a la luz roja	-	-	-	-	-	N
Aislado (<i>Isolated</i>)	CS	Gp'd	-	-	+	+
Acaparador (<i>Huddled</i>)	-	-	-	-	-	-
Encorvado (<i>Hunched posture</i>)	+/-	-	-	-	+	+
Abdomen punzante (<i>Pinched</i>)	-	-	-	-	-	-
Pelo erizado (<i>Starey coat</i>)	+/-	-	-	+	+	+
Respiración frecuencia/ * tipo (<i>breathing</i>)		60N	60N	70R	85R	85L
No acicalamiento (<i>Not grooming</i>)	-	-	-	+	+	+
Andar de puntillas (<i>Tiptoe walking</i>)	-	-	-	-	-	-
En el manejo						
No inquisitivo o alerta	-	-	-	-	-	+
No reflejo de estación (<i>Righting reflex</i>)	-	-	-	-	-	+
No come / bebe	-	-	-	-	+	+
Peso corporal (g) (<i>Bodyweight</i>)	300	295	290	291	265	250
% de cambio desde el principio			3,30 %		11,60 %	16,70 %
Temperatura corporal (° C)	37,3	37,8	37,4	38,1	36,1	35,1
Costra roja en los ojos / nariz (O/N)	-	+N	+N	+N	+O.N	+O.N
Orificios sucios (diarrea u orina)	-	-	-	-	+D	+D
No heces	-	-	-	-	-	-
Diarrea	-	-	-	-	+	+
Deshidratación-cola rígida, pellizco en piel	-	-	-	-	+	+
Raquis rígido	-	-	-	-	-	-
Extremidades azules	-	-	-	-	+	+
Vocalización	-	-	-	-	-	-
Dosificado (S/N) MTX 1 mg/kg	N	S	N	N	S	N
Otro						RIP
***Latidos del corazón donante	4+	4+	4+	4+	4+	4+
NAD (Nada anormal detectado)	✓	✓				
Firma:	INR	KS	INR	INR	KS	INR

Requerimientos especiales de estabulación
Habitación para la recuperación, veterinario, puede requerir calor

Detalles de puntuación:
*Respiración: R = rápida; S = superficial (*shallow*); L = laboriosa; N = normal*** latidos del corazón donante: 4+, 3, 2+, 1+, R (4+ = muy bien)

Punto final y acciones:
1. Inapetencia, diarrea, deshidratación por más de 48 h. El animal debe ser sacrificado
2. Una pérdida de un 20 % o más informar al investigador, al responsable de bienestar animal y al veterinario; más de un 25 % sacrificar el animal.

Medidas científicas
Si se sacrifica el animal recoger la gráfica cardiaca, bazo, timo, intestino delgado, médula ósea y 1 ml de sangre

ejemplo, la diarrea y la respiración), así como los criterios para llevar a cabo el punto final. Si un animal finalmente ha de ser sacrificado, se dan instrucciones sobre qué otras acciones deben llevarse a cabo, por ejemplo, qué tejidos hay que recoger o si hay que mantenerlos en formol; esto ayuda a asegurar que se obtiene la máxima información de cualquier animal del estudio. Mientras estas hojas llevan un tiempo rellenarlas, no es difícil para una persona experimentada ver si un animal no está bien y marcar simplemente la casilla NAD ("Nada Anormal Detectado"). Sin embargo, si un animal no está normal, llevará un tiempo examinarlo y decidir qué medidas deben

tomarse, pero ¿No es éste el precio por llevar a cabo una ciencia más humanitaria?

Interpretando la hoja de valoración

Vamos a verlo con el ejemplo completo de la hoja de valoración (tabla 1), en la que aparecen más signos positivos en la parte de la derecha que en la de la izquierda, aunque debemos resaltar algunos otros aspectos. Primero, puede observarse a lo largo de la parte superior de la hoja, que a medida que el animal fue empeorando, se fueron realizando registros diarios más frecuentemente. Durante el Día 0 (el día de la operación) se marcaron como anormales

uno o dos signos previsibles debidos a la anestesia y cirugía realizadas (baja temperatura corporal y encorvamiento) y por ello la casilla de NAD también fue marcada. El día siguiente (28 de Enero) se hicieron observaciones sobre la cantidad de alimento ingerido, la temperatura y el peso corporal y, de nuevo, la casilla NAD fue marcada. Sin embargo, hacia el final de ese día, el pelo dejó de estar liso, la temperatura corporal aumentó y la respiración se volvió más rápida. A la mañana siguiente (29 de Enero), hubo una significativa pérdida de peso (12%) la cual aumentó a lo largo del día hasta el 17%, lo cual es un fuerte indicador de que el animal no ha bebido ni comido mucho o tal vez nada y probablemente tenga diarrea. De hecho, ya por entonces había tantos signos clínicos fuera de lo normal que se decidió sacrificar al animal antes del final del experimento. La repentina aparición de diarrea con la concomitante rapidez de la pérdida de peso y la deshidratación, junto con la trabajosa respiración, postura anormal, falta de respuesta a la luz roja, etc. confirmaron que el animal se había visto comprometido fisiológicamente de forma seria y no iba a proporcionar más resultados válidos con respecto del objetivo científico. Más significativamente, su temperatura era de 35° C y las extremidades estaban azules (i.e. el color de los pies y las orejas). En nuestra opinión, este animal habría muerto esa misma noche, o incluso antes, a pesar de que se hubieran tomado medidas de reanimación.

Técnicos responsables

Con objeto de asegurar un continuado cuidado del animal y para mantener y actualizar las hojas de valoración, ponemos como responsable a un técnico/cuidador de animales o un veterinario, para que actúen conjuntamente con los investigadores y el resto de personal técnico. El papel del técnico responsable es: Verificar que los permisos y los protocolos aprobados están en orden y contrastarlos con lo que los investigadores en realidad pretenden hacer con los animales; revisar la hoja de valoración antes de que comience el experimento; conocer el propósito del experimento y de los objetivos científicos; familiarizarse con los procedimientos que van a ser llevados a cabo y los signos clínicos que esto pueda ocasionar; asegurar que todo el personal (cuidadores, técnicos, investigadores y

veterinarios) sepan como utilizar las hojas de valoración y puedan reconocer e interpretar claramente los signos clínicos que conlleven un punto final; revisar que los cuidadores y los técnicos no familiarizados con este experimento estén informados, por ejemplo, los suplentes de fin de semana y vacaciones; actuar conjuntamente con los investigadores en el diseño del experimento; ej. duración, número de animales, equipamiento, punto y final; actualizar las hojas de valoración basadas en nuevos signos o combinaciones de signos observados; e informar a las personas responsables, por ejemplo el veterinario o el investigador principal, de cualquier cosa concerniente a los animales o al personal implicado.

Hemos encontrado que las ventajas de las hojas de valoración incluyen: una perfecta observación de los animales por parte del personal en los momentos críticos, gracias a que indican en qué momento los animales encontrarán sus circunstancias más adversas; se evitan valoraciones subjetivas acerca del sufrimiento por parte del personal y los investigadores, dando pie a un diálogo más fructífero basado en las evidencias proporcionadas por los signos clínicos, que ayudan a los técnicos menos experimentados a conocer por qué un animal no está bien; aumenta la consistencia de la evaluación con puntuación, por razón de la limitación de las opciones posibles a marcar; permite evaluar mejor la efectividad de cualquier terapia que alivie los efectos adversos; ayuda a elegir el modelo experimental que causa menos dolor y sufrimiento, ayudando a refinar los procedimientos; nos ayuda a formar personas inexpertas en la evaluación de los efectos adversos o en algún procedimiento concreto; y nos hace posible llevar a cabo un análisis retrospectivo de los efectos adversos de cualquier procedimiento científico y de su grado de severidad. Más aún, las hojas de valoración muestran los signos clínicos que, de forma individual, o en conjunto, pueden utilizarse para indicar la severidad del procedimiento, así como las terapias paliativas o procedimientos concretos dentro de un experimento, por ejemplo la toma de muestras sanguíneas, para determinar el momento de punto final. Las hojas sirven, así mismo, para añadir a la ciencia las más cuidadosas observaciones llevadas a cabo a los animales. Un análisis de las hojas de valoración revela patrones de recuperación o deterioro y, en consecuencia, da una mejor idea del efecto del procedimiento sobre los animales desde el principio hasta el final.

Las hojas están siendo constantemente mejoradas y actualizadas gracias a la experiencia adquirida. Es sorprendente darse cuenta de que el proceso parece que nunca acaba, ya que a medida que el personal encuentra nuevos signos, el modelo experimental va siendo modificando. El personal también comienza a darse cuenta de las pautas de los efectos adversos que, cuando se toman como un todo, informan por adelantado de la muerte del animal o de un deterioro tal, que justifique el sacrificio del mismo. Tal información sirve para mejorar los cuidados, además de proporcionar la información para el reconocimiento de un déficit neurológico, tiempos de epilepsia (en un estudio encontramos que estos ataques suceden principalmente de noche), o pérdidas de peso, así como hallazgos inesperados, como la retención urinaria en un modelo de fallo renal.

Límites en la severidad y su implementación

En el Reino Unido, bajo el Decreto sobre animales de 1986 (Procedimientos Científicos) (*Animals Act* 1986), cada procedimiento tiene un límite de severidad siendo la pregunta cómo se puede reconocer este límite. En teoría hay cuatro bandas de severidad reconocidas: suave, moderada, sustancial y severa, pero ni el dolor severo, ni el sufrimiento severo, están permitidos bajo ninguna circunstancia. En un sentido, cómo se llamen las bandas es irrelevante, el problema es cómo son interpretadas. Para interpretarlas acertadamente y con reproducibilidad, se requiere una cuidadosa observación, donde las hojas de valoración que indican los signos clínicos cronológicamente se hacen inestimables (Morton y Griffiths 1985, Morton y Townsend 1995, Olfert 1995, 1996, 1998). Los límites de severidad pueden ser interpretados como grados de desviación de la normalidad, junto con otros indicadores de salud y calidad de vida. Por ejemplo, tomemos el peso corporal. Una pérdida de peso de hasta un 10, 20, 25, o más del 25% en pocos días, en comparación con los animales controles, pueden ser utilizada para interpretar respectivamente la severidad como leve, moderada, sustancial o severa. Sin embargo, el peso corporal por separado puede no ser suficiente en animales con tumores o ascitis, ya que en estos casos pueden haber aumentado su peso corporal, pero haber perdido condiciones corporales, como por ejemplo, la masa muscular,

experimentando un sufrimiento extremo. Ullman-Culleré y Foltz (1999) desarrollaron un buen método de estimación de las condiciones corporales en los ratones. Por otro lado, los animales diabéticos o con deficiencia pancreática exocrina con un pérdida del 25 % de peso corporal, pueden estar muy activos y tener una buena calidad de vida. Es importante, por consiguiente, que este acercamiento integral con signos clínicos tan claros, pueda ser utilizado para determinar el momento de punto final, equilibrando el beneficio científico con la investigación humanitaria

Punto final humanitario

En el pasado no era infrecuente confundir muerte como punto final (van den Heuvel *et al.* 1990). Sin embargo, la muerte está raramente relacionada con la variable experimental en estudio. No así efectos indirectos, como la deshidratación o la inanición de los animales incapaces de beber o comer. La deshidratación conlleva hemoconcentración y una creciente viscosidad de la sangre, a la cual el corazón no puede hacer frente, por lo que se produce un fallo cardíaco. En roedores, una ingesta inadecuada de comida puede desembocar en una baja temperatura corporal y su muerte. Un animal puede tardar varios días en morir y por ello debe establecerse un momento de punto final sustitutivo (Mellor y Morton 1997). Debemos determinar los signos clínicos que preceden irrevocablemente a la muerte y utilizarlos para decidir el momento de punto final pre-letal. Esta idea de utilizar anticipadamente los signos clínicos para predecir otros posteriores, requiere de estudios de validación, donde se demuestre que los animales seguramente progresarán en este sentido y que el momento de punto final puede basarse en este hecho. Los organismos oficiales que otorgan subvenciones, tienen la obligación moral de apoyar las investigaciones sobre el punto final humanitario. Estos métodos pueden utilizarse en los test de toxicidad; el testaje de medicamentos tales como la efectividad de una vacuna; la protección de roedores en el testaje de nuevos antibióticos; las evaluaciones de la virulencia de microorganismos o parásitos; los test sobre lotes de productos naturales o sintéticos, etc. Cussler *et al.* (1998) presentaron algunos datos sobre el test de potencialidad de una vacuna letal de la rabia, donde descubrieron que los ratones vacunados

con unas dosis determinadas de virus iban sufriendo una serie previsible de signos clínicos. Descubrieron que los animales que presentaban lentos movimientos circulares, invariablemente progresaban hasta la muerte, el tradicional punto final de la prueba, por lo que este hecho podría ser tenido en cuenta. Soothill *et al.* (1992), en una investigación sobre la efectividad de los fagos para estafilococos resistentes, mostraron que el sufrimiento del animal podía ser reducido en varias horas, si se consideraba una temperatura corporal menor de 35°C como el momento de punto final pre-letal. También se pueden ver otros ejemplos de punto final sustitutivo en Cussler *et al.* 1999 y Hendriksen *et al.* 1999.

Conclusión

El método de utilización de la hoja de valoración ha probado ser especialmente útil en los nuevos procedimientos, o cuando los usuarios no están seguros de los efectos que pueda tener un procedimiento sobre los animales. En mi experiencia, la literatura raramente refleja los efectos adversos producidos sobre los animales o el modo de evitarlos o medirlos, con lo que los investigadores tienen la obligación moral de hacerlo (Morton 1992). Estamos buscando afanosamente los medios para mejorar el cuidado de los animales, ya que está probado que mejoran la ciencia y evitan la pérdida inadvertida de animales. Estas hojas nos animan a todos a implicarnos en la observación de los animales y a reconocer los comportamientos normales y anormales de ellos, lo cual ayudará en algunos procedimientos a predecir sus respuestas. Esto, a su vez, ayudará a concebir nuevas técnicas de refinamiento experimental, poniendo de relieve el tipo y secuenciación de cualquier efecto adverso y, con ello, a mejorar los momentos de punto final sustitutivo por muerte o severidad extrema. No se necesita dinero para implementar muchas de las ideas de este informe, sin embargo, es esencial una correcta actitud de todo el equipo investigador si se tiene el deseo de que su utilización no le cause un sufrimiento innecesario a los animales.

References

- Balls M, Goldberg AM, Fentam JH, *et al.* (1995) The Three Rs: the way forward. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 11. *Alternatives to Laboratory Animals* **23**, 838–66
- Balls M (1999) The biomedical sciences and the need for less inhumane animal procedures. In: *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research* (Hendriksen CFM, Morton DB, eds). London: Royal Society of Medicine Press, pp 1–4
- CCAC (1998) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research and Testing*. Available from Canadian Council on Animal Care, Constitution Square, Tower II, 315–350 Albert Street, Ottawa, Ontario, Canada K1R 1B1
- Claassen V (1994) Neglected factors in pharmacology and neuroscience research. biopharmaceutics, animal characteristics, maintenance, testing conditions. In: *Techniques in the Behavioural and Neural Sciences*, Vol. 12. (Huston JP, ed). Amsterdam: Elsevier Science
- Cussler K, Morton DB, Hendriksen CFM (1998) *Klinische Endpunkte als Ersatz für die Bestimmung der Letalitätsrate bei Tollwutinfektionsversuchen zur Impfstoffprüfung*. *Altex (Alternativen zu Tierexperimenten Supplement)* **98**, 40–42
- Cussler K, Morton DB, Hendriksen CFM (1999) Humane endpoints in vaccine research and quality control. In: *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research* (Hendriksen CFM, Morton DB, eds). London: Royal Society of Medicine Press, pp 95–101
- DeGrazia D (1996) *Taking Animals Seriously: Mental Life and Moral Status*. Cambridge: Cambridge University Press
- Fry DJ (1999) Relating criteria for humane endpoints to objectives. In: *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research* (Hendriksen CFM, Morton DB, eds). London: Royal Society of Medicine Press, pp 54–7
- Hansen AK, Sandøe P, Svendsen O, Forsman B, Thomsen P (1999) The need to refine the notion of reduction. In: *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research* (Hendriksen CFM, Morton DB, eds). London: Royal Society of Medicine Press, pp 139–44
- Hendriksen CFM, Steen B, Visser J, Cussler K, Morton D, Streijger F (1999) The evaluation of humane endpoints in pertussis vaccine potency testing. In: *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research* (Hendriksen CFM, Morton DB, eds). London: Royal Society of Medicine Press, pp 106–13
- Mellor DJ, Morton DB (1997) Humane endpoints in research and testing. Synopsis of the workshop. In: *Animal Alternatives, Welfare and Ethics* (van Zutphen LFM, Balls M, eds). Amsterdam: Elsevier Science, pp 297–9
- Morton DB, Griffiths PHM (1985) Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record* **116**, 431–6

- Morton DB (1990) Adverse effects in animals and their relevance to refining scientific procedures. *Alternatives to Laboratory Animals* **18**, 29–39
- Morton DB, Burghardt G, Smith JA (1990) Critical anthropomorphism, animal suffering and the ecological context. *Hasting's Center Report Spring Issue on Animals, Science and Ethics* **20**, 13–19
- Morton DB, Townsend P (1995) Dealing with adverse effects and suffering during animal research. In: *Laboratory Animals—An Introduction for Experimenters*, revised edn (Tuffery AA, ed). Chichester: John Wiley & Sons Ltd, pp 215–31
- Morton DB (1992) A fair press for animals. *New Scientist* 11 April 1992, No. 1816, pp 28–30
- Morton DB (1995a) Recognition and assessment of adverse effects in animals. In: *Proceedings of Animals in Science Conference: Perspectives on their Use, Care and Welfare* (Johnston NE, ed). Monash University, pp 131–48
- Morton DB (1995b) The post-operative care of small experimental animals and the assessment of pain by score sheets. In: *Proceedings of Animals in Science Conference: Perspectives on their Use, Care and Welfare* (Johnston NE, ed). Monash University, pp 82–7
- Morton DB (1997a) A scheme for the recognition and assessment of adverse effects. In *Animal Alternatives, Welfare and Ethics* (van Zutphen LFM, Balls M, eds). Amsterdam: Elsevier Science, pp 235–41
- Morton DB (1997b) Ethical and refinement aspects of animal experimentation. In: *Veterinary Vaccinology* (Pastoret P-P, Blancou J, Vannier P, Verscheuren C, eds). Amsterdam: Elsevier Science, pp 763–85
- Morton DB (1998a) The recognition of adverse effects on animals during experiments and its use in the implementation of refinement. *Proceedings of the Joint ANZCAART/NAEAC Conference on Ethical Approaches to Animal-Based Science*, Auckland, New Zealand, 19–20 September 1997. ANZCCART, PO Box 19, Glen Osmond, SA 5064, Australia, pp 61–7
- Morton DB (1998b) The use of score sheets in the implementation of humane endpoints. *Proceedings of the Joint ANZCAART/NAEAC Conference on Ethical Approaches to Animal-Based Science*, Auckland, New Zealand 19–20 September 1997. ANZCCART, PO Box 19, Glen Osmond, SA 5064, Australia, pp 75–82
- Morton DB (1998c) The importance of non-statistical design in refining animal experimentation. ANZCCART Facts Sheet. *ANZCCART News* **11**, No. 2, June 1998 Insert, ANZCCART, PO Box 19, Glen Osmond, SA 5064, Australia, p 12
- Olfert ED (1995) Defining an acceptable endpoint in invasive experiments. *Animal Welfare Information Center Newsletter* **6**, 3–7
- Olfert ED (1996) Considerations for defining an acceptable endpoint in toxicological experiments. *Lab Animal* **25**, 38–43
- Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co [Special edition, 1992, Potters Bar: UFAW]
- Soothill JS, Morton DB, Ahmad A (1992) The HID50 (hypothermia-inducing dose 50): an alternative to the LD50 for measurement of bacterial virulence. *International Journal of Experimental Pathology* **73**, 95–8
- Ullman-Culleré MH, Foltz CJ (1999) Body condition scoring for assessing health status in mice. *Laboratory Animal Science* (in press)
- van den Heuvel MJ, Clark DG, Fielder RJ, *et al.* (1990) The international validation of a fixed dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Food Chemical Toxicology* **28**, 469–82
- Wadham JJB (1996) *Recognition and Reduction of Adverse Effects in Research on Rodents* (PhD thesis). Birmingham: University of Birmingham

Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio



La Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), se constituyó en 1989, con carácter exclusivamente científico y sin ánimo de lucro.

Los objetivos principales de la SECAL son racionalizar y mejorar la utilización, el conocimiento y la protección del Animal de Laboratorio al servicio de la salud del hombre y de los animales, procurando que los miembros de la Sociedad ejerzan la profesión con competencia y dignidad, fomentando la relación y cooperación entre los mismos, así como difundir todas las informaciones científicas y técnicas relativas al animal de Laboratorio, a través de la organización de cursos de Formación y el

Congreso Nacional de la Sociedad que se celebra cada 2 años.

Podrán pertenecer a esta Sociedad todas aquellas personas relacionadas profesionalmente con las Ciencias del Animal de Laboratorio.

La SECAL es miembro de FELASA, Federación of European Laboratory Animal Science Associations y de ICLAS, International Council for Laboratory Animal Science. FELASA proporciona un foro único de discusión a través del cual sus miembros pueden expresar un punto de vista europeo colectivo ante Organismos como la Unión Europea, el Parlamento Europeo e ICLAS.

Para conseguir más información sobre la Sociedad, dirigirse mediante internet a la página web:
<http://www.secal.es>

Secretaría de la S.E.C.A.L.:

Facultad de Medicina de la UAM (SECAL), C/ Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid.

Email: secretaria@secal.es, Tel. +34 91 497 54 76, Fax. +34 91 497 53 53.

Laboratory Animals Ltd.

Laboratory Animal Ltd. es una compañía limitada Británica con carácter benéfico no lucrativo, fundada en 1967. Su principal objetivo es la publicación de la revista *Laboratory Animals*.

Laboratory Animals publica artículos, revisados por expertos, acerca de todos los aspectos relacionados con los animales de laboratorio en la investigación biomédica. Se distribuye a más de 50 países siendo la revista oficial de varias sociedades Europeas dedicadas a las Ciencias del Animal de Laboratorio, como: FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), LASA (Laboratory Animal Science Association), GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde), ILAF (Israeli Laboratory Animal Forum), NVP (Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde), SECAL (Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio), SGV (Schweizerische Gesellschaft für Versuchstierkunde) y SPCAL (Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de Laboratório).



La compañía publica además monografías dentro de la serie *Laboratory Animals Handbooks*, encargándose de otras actividades, como la aportación de fondos para promover la formación en la tecnología, ciencia y bienestar del animal de laboratorio.

Laboratory Animals Ltd. está comprometida en la difusión de los principios de Russell y Burch sobre el Reemplazamiento, Reducción y Refinamiento, en todos los campos relacionados con el animal de experimentación. Además de la promoción de este concepto a través de la revista y otras publicaciones, otorga becas, financia conferenciantes en reuniones científicas y proporciona material de formación para su distribución a la comunidad científica.

La compañía está regida por un Consejo de Dirección formado por miembros de diferentes países.

Para más información sobre la Compañía o la revista incluyendo el acceso on-line puede dirigirse mediante internet a la dirección:

<http://www.lal.org.uk> o bien por fax al +44 1279 62 2573

Animal models of diabetes mellitus

D. A. Rees and J. C. Alcolado

Department of Medicine, University of Wales
College of Medicine, Cardiff, UK

Accepted 12 July 2004

Abstract

Animal models have been used extensively in diabetes research. Early studies used pancreatectomised dogs to confirm the central role of the pancreas in glucose homeostasis, culminating in the discovery and purification of insulin. Today, animal experimentation is contentious and subject to legal and ethical restrictions that vary throughout the world. Most experiments are carried out on rodents, although some studies are still performed on larger animals. Several toxins, including streptozotocin and alloxan, induce hyperglycaemia in rats and mice. Selective inbreeding has produced several strains of animal that are considered reasonable models of Type 1 diabetes, Type 2 diabetes and related phenotypes such as obesity and insulin resistance. Apart from their use in studying the pathogenesis of the disease and its complications, all new treatments for diabetes, including islet cell transplantation and preventative strategies, are initially investigated in animals. In recent years, molecular biological techniques have produced a large number of new animal models for the study of diabetes, including knock-in, generalized knock-out and tissue-specific knockout mice.

Diabet. Med. 22, 359–370 (2005)

Keywords experimental diabetes, rodent, mouse, rat, transgenics

Abbreviations BB, bio breeding; ES, embryonic stem; GK, Goto Kakizaki; IRS1, insulin receptor substrate 1; IRS2, insulin receptor substrate 2; MODY, maturity-onset diabetes of the young; NOD, non-obese diabetic; NSY, Nagoya–Shibata–Yasuda; OLETF rat, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat

Introduction

Animal experimentation has a long history in the field of diabetes research. The aim of this article is to review the commonly used animal models and discuss the recent technological advances that are being employed in the discipline. The review is based on an extensive literature search using the terms rodent, mouse, rat, animal model, transgenics, knockout, diabetes and pathogenesis, in scientific journal databases such as MEDLINE®. In addition, abstracts presented at meetings of Diabetes UK, the European Association for the Study of Diabetes and the American Diabetes Association over the last 5 years were examined in order to gain an appreciation of recent and ongoing research projects.

The topic is vast and this review is necessarily limited in its depth, intending to cover models of both Type 1 and Type 2 diabetes. Nevertheless, it should serve the purpose of updating practising clinicians and those not currently active in this type of research regarding the approaches that are currently being used. It should also serve as a starting point for those wishing to embark on an animal-based research project. Interested readers are pointed to the numerous specific reviews cited throughout this article and the excellent text ‘Animal Models of Diabetes: A Primer’ [1].

Ethical, moral and legal issues

At the outset, it is important to acknowledge that some people regard animal experimentation as an unjustified means of pursuing knowledge about human diabetes mellitus. There are those with the strongly held belief that it is morally indefensible for mankind to subject animals to experimental procedures that cause any degree of discomfort, as an animal is unable to

Correspondence to: Dr J. C. Alcolado, Department of Medicine, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff, CF14 4XN, UK.
E-mail: Alcolado@btinternet.com

Table 1 United Kingdom Acts of Parliament governing use of animals (a) and key aspects of the Animal (Scientific Procedures) Act 1986 (b)

(a)

Martin's Law 1822
Cruelty to Animals Act 1876
Protection of Animals Act 1911
Animals (Scientific Procedures) Act 1986

(b)

Protected animals

Any living vertebrate (except man) and the common octopus

Regulated procedures

Experimental or other scientific procedures applied to a protected animal which may have the effect of causing that animal pain, distress, suffering or lasting harm

Personal licences

The personal licence (PIL) authorizes persons with proper competence to actually perform the regulated procedures but only in conjunction with a project licence.

Project licences

The project licence (PPL) authorizes the specified work for a specified purpose with due regard to the balancing of benefit against severity.

Designation of establishment

The work must be performed in an establishment authorized for experimentation and/or breeding and supply. Each establishment must have a named animal care and welfare officer and a named veterinary surgeon.

provide informed consent and does not benefit directly or indirectly from the studies [2–4]. At the other extreme, a few medical scientists argue that they should be free to perform whatever experiments they consider appropriate with little or no external interference [5]. In the United Kingdom, mainly as a result of public concern regarding vivisection on unanaesthetized animals, a series of Acts of Parliament have been passed to control the use of animal experimentation (Table 1) [6,7]. It is important to note that legal constraints and the strictness with which they are enforced vary considerably around the world and even within Europe.

In the United Kingdom, animal research is currently controlled by the Animals (Scientific Procedures) Act 1986. This defines protected animals as any living vertebrate (except man) and the common octopus (*Octopus vulgaris*). Any experimental or other scientific procedures applied to a protected animal which may have the effect of causing that animal pain, distress, suffering or lasting harm are termed 'regulated procedures' and are illegal unless covered by appropriate licences. Note that killing a protected animal by certain methods (listed in Schedule 1 of the Act) does not require a licence, although appropriate training and skill is mandatory. An individual researcher must hold a Personal Licence (PIL) that authorizes them to actually perform regulated procedures on protected animals. The PIL is only granted after appropriate training and assessment and specifically lists those regulated procedures

and protected animals covered by the licence. However, the PIL can only be used in conjunction with a Project Licence (PPL). The PPL authorizes specified work for a specific purpose and must include a detailed protocol for each regulated procedure. Each procedure must be assessed for severity. In addition, the research can only be carried out in an institution that holds a 'Designation of Establishment' and this will include the appointment of a named animal care and welfare officer and a named veterinary surgeon. The entire system is overseen by a Home Office Inspector.

Thus, in the UK, a researcher wishing to embark on diabetes research involving animals will have to be working in a designated establishment and apply for both Project and Personal licences. Applications are reviewed by a local animal research ethics committee prior to submission to the Home Office and a timescale of 6–12 months for full authorization is not unusual. Recently, a high-profile group of UK academics have voiced concerns that they are increasingly unable to compete with research groups working in countries with far less stringent controls on animal experimentation [8].

Even if a certain experiment is legal to perform in the United Kingdom, the administrative arrangements and costs may mean that the study can be performed more quickly and cheaply in another country. Furthermore, some diabetes charities that rely heavily on public donations may come under pressure not to fund animal research [9]. For example, some donors may specifically seek reassurances that their money will not be used for animal research.

Animal models of hyperglycaemia

In the 1880s, von Mering was working on the absorption of fat from the intestine when Minkowski suggested he remove the pancreas of a dog. The animal developed polyuria and polydipsia and was found to have diabetes mellitus. Many experiments on rabbits and dogs followed, although history has given a special place to Marjorie, one of the dogs used by Banting and Best in their seminal experiments on the isolation and purification of insulin in the 1920s [10]. Marjorie is probably the most famous experimental animal in history, only to be superseded by Dolly the Sheep in recent years.

One of the most straightforward ways of studying the effects of hyperglycaemia in an animal is to remove the pancreas, either partially or totally. The species of animal used is determined by several factors. In general, the smaller the animal, the more manageable and cheaper the experiment. Hence, pancreatectomised rats and mice are the most commonly used. One of the guiding principles of animal research is to use the 'lowest' possible animal and, nowadays, permission would not be granted to remove the pancreas of a dog unless a similar experiment could not be performed in a rodent. However, a major criticism of using rodents is that they may not adequately reflect the human situation and occasionally justification is sought to use larger animals such as cats, dogs, pigs and primates.

Table 2 Substances with a diabetogenic effect in experimental animals

Alloxan
Streptozotocin
Vacor
Dithizone
8-hydroxyquinolone

Non-surgical methods of inducing hyperglycaemia by damaging the pancreas also exist. These include the administration of toxins such as streptozotocin [11] and alloxan [12]. Table 2 lists a variety of agents known to produce diabetes in experimental animals and streptozotocin is discussed further below.

Surgical and toxin-mediated pancreatic damage are valuable tools in the study of the consequences of hyperglycaemia, e.g. the development of diabetic complications [13–19]. When performed on female animals, they may be used to study the effect of gestational diabetes on the offspring [20–23]. Trying to control the hyperglycaemia by the administration of insulin or oral hypoglycaemic agents can further refine the experiments [24]. However, it is almost impossible to restore normoglycaemia in pancreatectomised animals [25].

Much of the research on islet cell transplantation has relied on the use of rodents previously rendered diabetic by the techniques described above. It is then possible to transplant islets and study the consequences. Islets may be transplanted with or without capsules designed to inhibit rejection [26], either subcutaneously [27], under the renal capsule [28] or seeded by the portal vein into the liver [29]. Animals can then be given a variety of anti-rejection therapies [30–32]. Even if human patients were to give informed consent for such studies, it is difficult to envisage how such a large number of experimental conditions could be replicated without using animal models. Nevertheless, it is important to remember that what works in a rat may not work in a human and that the ultimate success of islet cell transplantation programmes will be gauged by data from human studies.

Away from the high-profile field of islet-cell transplantation, diabetic rodents are routinely used in the assessment of new pharmacological agents with a potential role for treating humans with the disease. Thus, all new orally active agents will be tested for efficacy and safety in rodent models. Sometimes this leads to potentially interesting and unexpected findings, such as the possibility that PPAR γ agonists may preserve β -cell mass [33]. Other times, less welcome results are obtained, such as the development of tumours in rats treated with an insulin analogue [34].

Animal models of glycosuria

Phlorizin is a naturally occurring flavinoid that, when injected subcutaneously, binds to the Na/glucose transporter in the proximal renal tubule and inhibits the resorption of glucose [35]. The administration of phlorizin to a rodent with diabetes can produce near-normoglycaemia [36], at the expense of

massive glycosuria and polyuria. This model may be used to study the role of hyperglycaemia in the development of diabetic complications [37–41] and can help disentangle the effects of glucose from the myriad of other metabolic consequences of experimental diabetes.

Animal models of Type 1 diabetes mellitus

Type 1 diabetes mellitus in humans is characterized by a specific destruction of the pancreatic β cells, commonly associated with immune-mediated damage [42]. Although the damage may occur silently over many years, at clinical presentation there is little surviving β cell mass and the disorder progresses to absolute insulinopaenia.

Streptozotocin is a nitrosurea derivative isolated from *Streptomyces achromogenes* with broad-spectrum antibiotic and anti-neoplastic activity [43]. It is a powerful alkylating agent that has been shown to interfere with glucose transport [44], glucokinase function [45] and induce multiple DNA strand breaks [46]. A single large dose of streptozotocin can produce diabetes in rodents, probably as a result of direct toxic effects. Alternatively, multiple small doses of streptozotocin are used (e.g. 40 mg/kg on five consecutive days). In susceptible rodents this induces an insulinopenic diabetes in which immune destruction plays a role, as in human Type 1 diabetes.

The multiple low-dose streptozotocin model has been used extensively to study the immunological pathways that lead to insulinitis and β cell death [47–52]. However, the agent will produce diabetes even in the absence of functional T and B cells [53] and, in contrast to the spontaneous animal models discussed below, diabetes cannot be reliably transferred to syngenic recipients by the transfer of splenocytes [54].

Spontaneous animal models of Type 1 diabetes

The non-obese diabetic (NOD) mouse and bio breeding (BB) rat are the two most commonly used animals that spontaneously develop diseases with similarities to human Type 1 diabetes (Table 3). It should be noted that these animals have been inbred in laboratories for many generations, by selecting for hyperglycaemia. As a result of this process, many genes and phenotypes will have been enriched, but not all will be relevant to the pathophysiology of diabetes, either in rodents or in humans.

Table 3 Animal models of Type 1 diabetes

NOD (non-obese diabetic) mouse
BB (bio breeding) rat
LETL (Long Evans Tokushima lean) rat
New Zealand white rabbit
Keeshond dog
Chinese hamster
Celebes black ape (<i>Macacca nigra</i>)

The NOD mouse

The NOD mouse was developed by selectively breeding offspring from a laboratory strain that in fact was first used in the study of cataract development (the JcI-ICR mouse) [55]. Insulinitis is present when the mice are 4–5 weeks old, followed by subclinical β -cell destruction and decreasing circulating insulin concentrations. Frank diabetes typically presents between 12 and 30 weeks of age. Unlike human Type 1 diabetes, ketoacidosis is relatively mild and affected animals can survive for weeks without the administration of insulin. Also, in contrast to the findings of most studies in humans, there is a larger gender difference with 90% of females, but only 60% of males developing diabetes in some colonies [56].

In comparison with other animal models used in biomedical research, the NOD mouse seems particularly analogous to human Type 1 diabetes and thus a great many studies have been performed in the 25 years since its development. For example, genetic studies have localized multiple susceptibility genes and, as with humans, the MHC region plays a key role [57]. Genetic linkage studies in humans are always hampered by the need to collect a large number of families, concerns regarding paternity, and the reliance on whatever pattern of mating has occurred within the population. Animal studies circumvent all of these problems as it is possible to study large numbers of offspring from whichever mating the researcher chooses to set up.

Inbred animals such as the NOD mouse also have benefits when studying other features of diabetes, as genetic heterogeneity need not be considered as a confounding factor. For example, studies have tried to piece together the immunological cascade that includes T-helper type 2 (Th_2) cells, effector cells (CD4+, CD8+) and the contribution of cytokines [58–62].

The BB rat

The BB rat was first recognized in the Bio Breeding Laboratories, a commercial breeding company based in Ottawa, in 1974 [63]. In diabetes prone strains, weight loss, polyuria, polydipsia, hyperglycaemia and insulinopenia develop at around 12 weeks of age, often at the time of puberty. In common with the human disease, ketoacidosis is severe and fatal unless exogenous insulin is administered [64]. As with the NOD mouse, the pancreatic islets are subjected to an immune attack with T cells, B cells, macrophages and natural killer cells being recruited to the insulinitis [65–69]. A variety of auto-antibodies, including GAD, have been reported in both BB rats and the NOD mouse, although it remains far from clear which, if any, of these are primary autoantigens [70,71].

BB rat strains prone to diabetes typically have profound T-cell lymphopenia in the circulating blood, specifically lacking T cells that express ART2 [72]. Transfusion of histocompatible T cells expressing ART2 will prevent the spontaneous development of hyperglycaemia in BB rats. Genetic studies

have identified several susceptibility genes, including loci in the MHC region [73–75].

Prevention of diabetes in NOD mouse and BB rat

Rodent models of Type 1 diabetes have been employed in research examining the role of diet (e.g. cow's milk proteins) [76–79] and a variety of viruses [80–84] as environmental triggers for the disease. For example, infection with the mouse hepatitis virus decreases the incidence of diabetes in NOD mice, whilst infection with Kilham rat virus increases the risk in BB rats [85]. Immunosuppression with cyclosporin in combination with other immuno-modulatory compounds such as vitamin D helps prevent diabetes in both BB rats and NOD mice [86,87]. Non-specific immunization with Freund's adjuvant will also prevent diabetes in these rodent models [88,89]. Insulin has been administered orally in the hope of inducing tolerance and reducing the immune attack on the pancreatic islets. Some, but not all, studies have shown this strategy can prevent diabetes in the NOD mouse and BB rat [90,91]. Nicotinamide is known to protect β cells from toxins such as alloxan and also helps prevent the onset of diabetes in NOD mice [92].

As a result of these observations, several trials in humans at high risk of diabetes have been undertaken, including the use of oral insulin and nicotinamide. Unfortunately the results are currently disappointing [93].

Animal models of Type 2 diabetes

Type 2 diabetes represents a heterogeneous group of disorders characterized by insulin resistance and impaired insulin secretion and defined by a raised fasting or post-challenge blood glucose. Some subtypes of diabetes are now recognized as being because of specific single gene defects [e.g. the maturity-onset diabetes of the young (MODY) syndromes [94], syndromes of severe insulin resistance [95] and mitochondrial diabetes [96]]. However, for most patients with diabetes, several (if not many) genetic and environmental factors contribute to the causation and progression of the disease and also the late complications.

Animal models of Type 2 diabetes are likely to be as complex and heterogeneous as the human condition. Advances are most likely to come from interpreting data from several sources (Table 4). Thus, in some animals, insulin resistance predominates, whilst in others β -cell failure is pre-eminent. Models where glucose intolerance is part of a wider phenotype of obesity, dyslipidaemia and hypertension may also provide valuable insights into human Type 2 diabetes. As with the NOD mouse and BB rat in Type 1 diabetes, the selective inbreeding of animals that spontaneously develop a Type 2 diabetes-like phenotype has generated many of the strains used today. Much can also be learnt from animals with single gene mutations, as evidenced to by the advances in knowledge generated from the study of the ob/ob, db/db, fa/fa and agouti strains [97–101].

Table 4 Animal models of Type 2 diabetes mellitus

Ob/Ob mouse—monogenic model of obesity (leptin deficient)
db/db mouse—monogenic model of obesity (leptin resistant)
Zucker (fa/fa) rat—monogenic model of obesity (leptin resistant)
Goto Kakizaki rat
KK mouse
NSY mouse
OLETF rat
Israeli sand rat
Fat-fed streptozotocin-treated rat
CBA/Ca mouse
Diabetic Torri rat
New Zealand obese mouse

Rodent models of monogenic obesity and diabetes

Obesity and the consequent insulin resistance is a major harbinger of Type 2 diabetes mellitus in humans. Consequently, animal models of obesity have been used in an attempt to gain insights into the human condition. Some strains maintain euglycaemia by mounting a robust and persistent compensatory β -cell response, matching the insulin resistance with hyperinsulinaemia. The ob/ob mouse and fa/fa rats are good examples of this phenomenon. Others, such as the db/db mouse and *Psammomys obesus* (discussed later) rapidly develop hyperglycaemia as their β -cells are unable to maintain the high levels of insulin secretion required throughout life. Investigation of these different animal models may help explain why some humans with morbid obesity never develop Type 2 diabetes whilst others become hyperglycaemic at relatively modest levels of insulin resistance and obesity.

Significant advances have been made in the field of obesity research using these rodent models. In 1994, Friedman and colleagues reported the cloning of the mutation responsible for the massive obesity seen in the ob/ob mouse [99]. The defective ob gene coded for a protein secreted by adipocytes and termed leptin. The db/db mouse and fa/fa rat were subsequently found to harbour mutations in a hypothalamic receptor for leptin [100,101].

The Goto Kakizaki (GK) rat

The GK rat was developed by the selective breeding of Wistar rats with the highest blood glucose over many generations [102]. The rats develop relatively stable hyperglycaemia in adult life. Typically, the fasting blood glucose is only mildly elevated but rises further on challenge with glucose. Both insulin resistance and impaired insulin secretion are present. At birth, the GK rat has a reduced number of islets [103]. Inheritance is polygenic and several genome-wide scans have identified putative susceptibility loci on a variety of chromosomes [104–106]. In common with human Type 2 diabetes mellitus, an excess of maternal transmission has been reported in some but not all studies [107].

The GK rat, in common with other animal models of diabetes, develops some features that can be compared with the complications of diabetes seen in humans. These include renal lesions [108], structural changes in peripheral nerves [109] and abnormalities of the retina [110]. Research into these phenomena represents another example of how animal experimentation opens up areas that could not be easily studied in man. For example, serial renal or nerve biopsies cannot be ethically performed in human patients and it is similarly difficult to measure the concentrations of intraocular growth factors without recourse to rodent models. However, there are certainly differences between the complications seen in animal models and humans and debate exists as to whether any currently available animal model accurately reflects the diabetic complications seen in man.

The KK mouse

The original strain of this mouse was bred for large body size [111]. Characteristically, the mouse gradually becomes obese in adult life, associated with insulin resistance, compensatory hyperinsulinaemia and islet cell hyperplasia. Eventually, mild hyperglycaemia supervenes [112]. Food intake is important in determining the severity of the diabetic phenotype and restriction of energy intake reduces both the obesity and hyperglycaemia seen in this strain of mice. Several different lines have been bred throughout the world and, because of selective breeding and founder effects, these vary both genetically and phenotypically from each other. For example, in one line of KK mice, a glycoprotein gene (*Azgp1*) has been postulated as playing a role in susceptibility to obesity and diabetes [113], but it is not clear whether this is true for other strains. Although all KK mouse strains can ultimately be traced back to animals distributed from the original colony described in 1967 [111], some differences may now exist in colonies maintained in different laboratories throughout the world. Reasons for this include the difficulty in ensuring 100% genetic homogeneity amongst inbred strains, even after many generations of selective breeding. Furthermore, new spontaneous mutations may occur in isolated breeding colonies in different laboratories and these can become ‘fixed’ in one particular colony and not another. This might explain the lack of concordance between studies designed to identify the precise genetic susceptibility loci in this animal model of diabetes [114]. Such differences should always be borne in mind when assessing results from similar experiments performed by different laboratories that are apparently using the same animal model of diabetes.

The decision of which rodent model of diabetes to use for any particular experiment is often multifactorial. Ideally, experiments should be carried out in several different types of animal although, in practice, individual research groups tend to build up experience with one strain. For example, reasons for using the KK mouse rather than the GK rat include the superiority of the KK mouse in mimicking human obesity (the GK rat being relatively slim) and the generally easier production

of transgenic variants from mice rather than rats. It is important to realize that, in general, one animal model represents only one aspect or subtype of diabetes in humans and care must always be taken when extrapolating results to the clinical setting

The Nagoya–Shibata–Yasuda (NSY) mouse

As with the KK mouse, this model was developed by selective inbreeding, but on this occasion using a laboratory strain of mouse termed Jc1:ICR (which is also the ancestral strain from which NOD mice were developed). NSY mice spontaneously develop diabetes in an age-dependent manner. Key features include impaired insulin secretion in the face of mild insulin resistance. Obesity is not a major feature of these animals and there is a marked gender difference with almost all males developing hyperglycaemia, but less than a third of females, being affected [115]. This gender difference is a generalized characteristic for most animal models of Type 2 diabetes mellitus.

The NSY mouse is particularly useful when considering age-related phenotypes (e.g. decline in β -cell function). Of interest, a genome-wide linkage scan has identified a sequence variation in the hepatic nuclear factor 1 β gene, a gene also implicated in human MODY syndrome [116].

Psammomys obesus (the Israeli sand rat)

In its natural habitat, the Israeli sand rat has an essentially vegetarian diet. However, when fed laboratory chow, the animals become obese, insulin resistant and hyperglycaemic [117]. If a cholesterol-rich diet is used, hyperlipidaemia and atherosclerosis develop [118]. In common with human Type 2 diabetes mellitus, the hyperglycaemic state is associated with an increase in circulating proinsulin and split products presumably because of the high demand for insulin secretion driven by insulin resistance. Impaired insulin biosynthesis within the islets has also been reported [119].

As with the KK mouse, the Israeli sand rat model is particularly useful when studying the effects of diet and exercise [120] on the development of Type 2 diabetes.

The Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rat

The OLETF rat originates from an outbred colony of Long-Evans rats selectively bred for glucose intolerance [121]. The rats are mildly obese and, as with NSY mice, males are more likely to develop diabetes in adult life than females. Genome-wide scans have reported susceptibility loci on chromosomes 1,7,14 and also the X chromosome [122,123]. Interestingly, OLETF rats also carry a null allele for the cholecystokinin A receptor which may be involved in the regulation of food intake [124], however, whether this is causally related to the phenotype is still unclear. Genetic studies in both animals and humans are complex, given the many susceptibility and

protective loci that contribute to the overall risk of diabetes and/or obesity. Animal studies have the advantage of allowing the study of large numbers of individuals with precisely known ancestry and the ability to set up back-crosses and matings at will. However, inbreeding will also enrich genetic variants in a strain that may have no causal relationship to diabetes itself.

Gene targeting and transgenic techniques

An explosion in the number of animal models used for the study of diabetes has come from the use of molecular biological techniques. Gene targeting refers to the process by which a single gene may be disrupted in an embryonic stem cell and then transmitted along the germ cell line. This produces 'knockout' animals. Transgenics refers to the incorporation of modified genes (transgenes) into the pronucleus of a zygote. The transgene is randomly incorporated into the host genome and some offspring will therefore express the modified gene. Theoretically, these techniques allow the selective perturbation of a single element of a complex system. For example, rodents may be produced that over- or under-express proteins thought to play a key part in glucose metabolism.

Briefly, it is possible to superovulate a female mouse or rat and allow her to mate. The following day, the single cell zygotes are harvested and maintained in culture for a few hours. A genetic construct (e.g. the insulin gene) can then be injected into the pronucleus of the zygote. The construct will integrate itself into the genome of the zygote and, if this occurs at an appropriate part of the host DNA, the result is an embryo that will over-express insulin in adult life. By including specific promoter regions in the genetic construct, it is possible to gain some control over how the transgene is expressed in adult life. For example, by including the metallothionein promoter, the inserted gene will be 'switched on' by the *in-vivo* administration of heavy metals to the adult (Fig. 1).

A number of factors must be taken into account when studying the offspring of these transgenic experiments. As the transgenes are incorporated at random into the host genome, the effect observed in offspring will vary depending on precisely where the integration has occurred and also the number of copies that have successfully integrated. In some cases the transgene disrupts a native gene at the site of its incorporation into the genome, further complicating the interpretation of the resultant phenotype. In addition, the effect of transgene expression is strongly modified by the genetic background of the mice, so that results may vary depending on which particular strain is employed.

Knockout animals are produced by using a genetic construct that will disrupt a normal gene. Typically, a construct is developed that contains DNA sequences homologous to the target gene but that are disrupted or contain a deletion. These are injected into embryonic stem (ES) cells and will undergo recombination with the normal gene, causing it to be 'knocked out'. The construct is usually engineered to contain an antibiotic resistance sequence and this allows selection of the ES cells

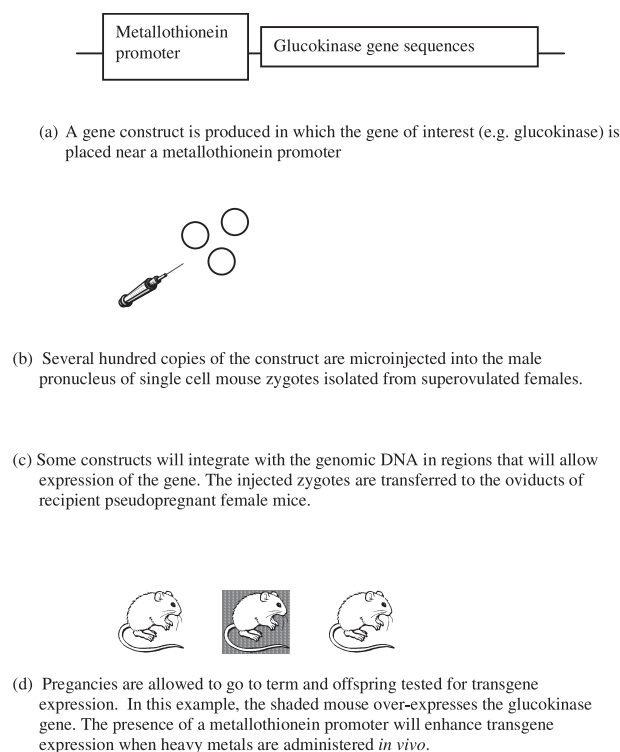


Figure 1 Producing transgenic animals that over-express a gene.

that have successfully incorporated the DNA. ES cells are then injected into pre-implantation mouse embryos and transferred to the oviducts of pseudopregnant mice and allowed to develop to term. When the ES cells have contributed to the germ line of the offspring, selective breeding will allow the production of mice that are either heterozygous or homozygous for the knockout (Fig. 2).

Using these approaches, a large number of animals have been produced in an attempt to gain insights into the pathogenesis of both Type 1 and Type 2 diabetes. Some of these are listed in Table 5.

Table 5 Transgenic animals in diabetes research

Gene	Copy number	Phenotype	Reference
Insulin receptor	0	Severe hyperglycaemia, neonatal death from ketoacidosis	125
Insulin receptor	1 (in muscle)	Mild insulin resistance	126
IRS1	0	Mild insulin resistance Normoglycaemia Growth retardation	127
IRS2	0	Hyperglycaemia Insulin resistance Reduced β -cell mass	128, 129
Glucokinase	0	Severe hyperglycaemia Perinatal death	130
Glucokinase	1	Non-progressive glucose intolerance	130
GLUT4	> 2	Increased insulin sensitivity	131

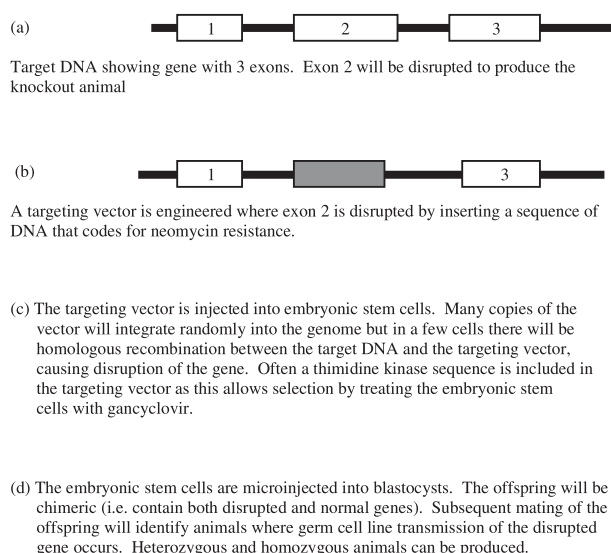


Figure 2 Steps in the production of knockout animals.

The targeted gene disruption and transgenic approaches are not without limitations. Simply over- or under-expressing a single gene will result in many others being altered as a compensatory mechanism. For example, completely knocking-out the insulin receptor substrate 1 (IRS1) gene produces remarkably little in the way of effect given the central role that this protein has in intracellular signalling [127]; redundancy within the insulin signalling cascade overcomes the genetic manipulation. Homozygote knockouts of the insulin receptor substrate 2 (IRS2) gene, however, do develop diabetes by 10 days of age, associated with insulin resistance in the liver and reduced pancreatic β -cell mass [128].

Other difficulties with classical gene disruption techniques include the fact that homozygote knockouts are sometimes lethal in utero so adults cannot be studied. Some genes have quite different functions during embryogenesis than in adult

life and the knockout cannot be timed to occur during specific periods of the animal's life. In addition, animals will have altered gene expression in many tissues, not necessarily just those of physiological importance. One way of overcoming this limitation is to produce animals in which the gene being studied is only knocked out in specific tissues.

Tissue-specific knockouts

Cre is a bacteriophage P1 recombinase enzyme that recognizes specific sequences of DNA 34-bp long (LoxP sites). When two of these sites occur close together, Cre will cut out the DNA between them. In the laboratory, it is possible to engineer a DNA construct in which Cre is placed next to a tissue-specific promoter (e.g. the insulin gene promoter). Using the techniques for creating transgenic animals outlined above, offspring can be produced that will have the Cre construct in all their tissues, but it will only be active in sites where the insulin gene promoter is active (i.e. pancreatic β cells). A second set of transgenic animals can be produced that have, for example, the insulin receptor gene flanked by the target lox P sites (Fig. 3). By mating the two animals together, one can develop a line of animals where the insulin receptor gene is only knocked out in pancreatic β cells. Similarly, animals can be produced that have a gene knocked out in other specific tissues such as liver, adipose tissue or brain.

This very powerful technique has produced much interesting data in recent years. For example, an animal model of mitochondrial diabetes was developed by knocking out the mitochondrial transcription factor mtFA only in the pancreatic β cells [132]. If mtFA had been knocked out in all tissues of the animal, as occurs in classical transgenics, the phenotype would have been very difficult to interpret and it would not have been possible to answer specific questions about the role of mtDNA defects within β cells. The adult animals developed insulinopenic diabetes, similar to diabetes as a result of mtDNA defects in humans. Some other tissue-specific knock-

outs that have been developed in recent years are shown in Table 6.

Animal models of diabetes in pregnancy and the role of intrauterine environment

Another important field of diabetes research that has relied heavily on animal experimentation is the study of diabetes in pregnancy and the role of the intrauterine environment on the subsequent development of diabetes amongst offspring.

Firstly, it has been shown that diabetes in pregnancy predisposes to the later development of diabetes amongst offspring. Thus, pups born from rats rendered diabetic by streptozotocin treatment are more likely to become diabetic in adult life than litters born from the same mother before she received the streptozotocin [138]. In embryo transfer experiments, Wistar rats (at low genetic risk of diabetes) are more likely to develop hyperglycaemia as adults if they are reared in the uterus of a Goto Kakizaki (diabetic) mother than a euglycaemic mother. However, transferring Goto Kakizaki embryos into a normal (Wistar) uterus does not seem to reduce their risk of developing diabetes [139].

Secondly, it has been shown that intrauterine malnutrition may also increase the risk of diabetes amongst offspring in later life. This has been achieved by a variety of means, including uterine artery ligation [140] and dietary restriction of pregnant dams [141]. Endocrine pancreas development is altered in foetuses from rats previously showing intrauterine growth retardation in response to malnutrition [142].

The diabetogenic effects of manipulating the intrauterine environment are probably mediated by a permanent programming of the developing offspring, e.g. by the mechanism of imprinting. Of interest, the increased risk of diabetes continues into subsequent generations, suggesting the changes also affect the germ cell line [143].

Conclusions

There is little doubt that some animal models of diabetes have provided an invaluable insight into the pathogenesis of the human disease. Patients have directly benefited from the use of animals in the discovery of insulin and the assessment of other treatments. However, there have been 'blind-alleys' in research as well, such as the lack of reproducible paradigms of human diabetic complications and the disappointing results of studies aimed at preventing Type 1 diabetes based on strategies that are successful in rodents.

Table 6 Tissue-specific knockouts in diabetes

Genetic knockout	Tissue specificity	Reference
Insulin receptor	β cells, brown fat, liver, muscle, brain	133
PPAR γ	β cells	134
GLUT4	Muscle	135
IGF1	Liver	136

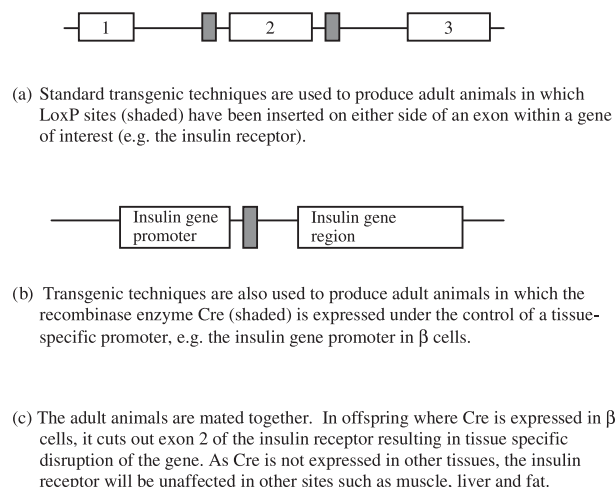


Figure 3 Production of tissue-specific knockout animals.

Animal research in the United Kingdom is governed by the three Rs—reduction, refinement and replacement. Strenuous efforts should be made to reduce the number of animals required for any particular study, experimental design should be refined so that it causes the least discomfort to the animals and, ultimately, animal models should be replaced altogether. Care should always be taken when comparing results from apparently similar experiments performed in different institutions and when extrapolating results from animal experiments to the human situation. Despite these caveats, significant advances in knowledge have arisen in recent years, especially with the advent of transgenics. It is likely that animal models will play an important role in the eventual cure of human diabetes mellitus.

Competing interests

None declared.

References

- 1 Sima AAF, Shafrir E, eds. *Animal Models of Diabetes: A Primer*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000.
- 2 British Union for the Abolition of Vivisection. Home page. Available from: <http://www.buav.org>.
- 3 Patterson C. *Eternal Treblinka. Our Treatment of Animals and the Holocaust*. New York: Lantern Books, 2002.
- 4 Regan T. *Defending Animal Rights*. Chicago: University of Illinois Press, 2001.
- 5 Brom FW. Science and society. Different bioethical approaches towards animal experimentation. *ALTEX* 2002; **19**: 78–82.
- 6 *Animal (Scientific Procedures) Act 1986*. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986.
- 7 *Guidance on the Operation of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986*. London: The Stationery Office, 2000.
- 8 Blakemore C, Boyd K, Ward L. Research involving animals. *Nature* 1995; **374**: 670.
- 9 Diabetes UK. *Animal Research. Position Statement from Diabetes UK*. 2002. Available from: <http://www.Diabetes.org.uk/infocentre/state/animals.html>.
- 10 Bliss M. *The Discovery of Insulin*. Chicago: University of Chicago Press, 2000.
- 11 Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; **48**: 2129–2139.
- 12 Lenzen S, Patten U. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 1988; **31**: 337–342.
- 13 Salgado HC, Fazan Junior R, Vazan VP, Da Silva VJ, Barreira AA. Arterial baroreceptors and experimental diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2001; **940**: 20–27.
- 14 Yu DY, Cringle SJ, Su EN, Yu PK, Jerums G, Cooper ME. Pathogenesis and intervention strategies in diabetic retinopathy. *Clin Exp Ophthalmol* 2001; **29**: 164–166.
- 15 Reagan LP, Magarinos AM, McEwan BS. Neurological changes induced by stressing streptozotocin diabetic rats. *Ann NY Acad Sci* 1999; **893**: 126–137.
- 16 Flyvbjerg A, Landau D, Domene H, Hernandez L, Groenbaek H, LeRoith D. The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease. *Metabolism* 1995; **44**: 67–71.
- 17 Garcia-Martin JJ, Villanueva GR, Esteller A. Diabetes-induced cholestasis in the rat: possible role of hyperglycemia and hypoinsulinemia. *Hepatology* 1988; **8**: 332–340.
- 18 Hosokawa YA, Hosokawa H, Chen C, Leahy JL. Mechanism of impaired glucose-potentiated insulin secretion in diabetic 90% pancreatectomy rats. Study using glucagons like peptide 1(7–37). *J Clin Invest* 1996; **97**: 180–186.
- 19 Logan JL, Lee SM. The effects of subtotal pancreatectomy on renal growth in streptozotocin diabetic rats. *Life Sci* 1988; **42**: 247–253.
- 20 Caluwaerts S, Holemans K, van Bree R, Verhaeghe J, Van Assche FA. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes mellitus. *J Soc Gynecol Invest* 2003; **10**: 216–221.
- 21 Merzouk H, Madani S, Boualga A, Prost J, Bouchenak M, Belleville J. Age-related changes in cholesterol metabolism in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Lipid Res* 2001; **42**: 1152–1159.
- 22 Plagemann A, Harder T, Janert U, Rake A, Rittel F, Rohde W *et al*. Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinaemic offspring of rats with gestational diabetes. *Dev Neurosci* 1999; **21**: 58–67.
- 23 Van Assche FA, Aerts L, Holemans K. The effects of maternal diabetes on the offspring. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1991; **5**: 485–492.
- 24 Herrera E, Palacin M, Martin A, Lasuncion MA. Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes* 1985; **34**: 42–46.
- 25 Harder T, Franke K, Farhenkrog S, Aerts L, Van Bree R, Van Assche FA *et al*. Prevention by maternal pancreatic islet transplantation of hypothalamic malformation in offspring of diabetic mother rats is already detectable at weaning. *Neurosci Lett* 2003; **352**: 163–166.
- 26 Lanza RP, Ecker DM, Kuhtrieber WM, Marsh JP, Ringeling J, Chick WL. Transplantation of islets using microencapsulation: studies of diabetic rodents and dogs. *J Mol Med* 1999; **77**: 206–210.
- 27 Wang W, Gu Y, Hori H, Sakurai T, Hiura A, Sumi S *et al*. Subcutaneous transplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells normalizes hyperglycaemia in diabetic mice. *Transplantation* 2003; **27**: 290–296.
- 28 Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Chronically decreased oxygen tension in the rat pancreatic islets transplanted under the kidney capsule. *Transplantation* 2000; **69**: 761–766.
- 29 Trimble ER, Karakash C, Malaisse-Lagae F, Vassutine I, Orci L, Renold AE. Effects of intraportal islet transplantation on the transplanted tissue and recipient pancreas. I. Functional studies. *Diabetes* 1980; **29**: 341–347.
- 30 Maeda A, Goto M, Zhang J, Bennet W, Groth CG, Korsgren O *et al*. Immunosuppression with FTY720 and cyclosporine A inhibits rejection of adult porcine islet xenografts in rats. *Transplantation* 2003; **75**: 1409–1414.
- 31 Wennberg L, Song Z, Bennet W, Zhang J, Nava S, Sundberg B *et al*. Diabetic rats transplanted with adult porcine and immunosuppressed with cyclosporine A, mycophenolate mofetil, and leflunomide remain normoglycaemic for up to 100 days. *Transplantation* 2001; **71**: 1024–1033.
- 32 Jahr H, Hussmann B, Eckhardt T, Bretzel RG. Successful single donor islet allotransplantation in the streptozotocin diabetes rat model. *Cell Transplantation* 2002; **11**: 513–518.
- 33 Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T *et al*. β -cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 2001; **50**: 1021–1029.
- 34 Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K, Sorensen AR, Wilberg FC, Klein HH *et al*. Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J* 1996; **315**: 271–279.
- 35 Lotspeich WD, Woronkow S. Some quantitative studies on Phlorizin inhibition of glucose transport in the kidney. *Am J Physiol* 1958; **195**: 331–336.

- 36 Janssen SW, Martens GJ, Sweep CG, Span PN, Verhofstad AA, Hermus AR. Phlorizin treatment prevents the decrease in plasma insulin levels but not the progressive histopathological changes in the pancreatic islets during aging of Zucker diabetic fatty rats. *J Endocrinol Invest* 2003; **26**: 508–515.
- 37 Leung MB, Choy KW, Copp AJ, Pang CP, Shum AS. Hyperglycaemia potentiates the teratogenicity of retinoic acid in diabetic pregnancy mice. *Diabetologia* 2004; **47**: 515–522.
- 38 Laybutt DR, Sharma A, Sgroi DC, Gaudet J, Bonner-Weir S, Weir GC. Genetic regulation of metabolic pathways in β -cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem* 2002; **277**: 10912–10921.
- 39 Ling ZC, Hong-Lie C, Ostenson CG, Efendic S, Khan A. Hyperglycemia contributes to impaired insulin response in GK rat islets. *Diabetes* 2001; **50**: S108–S112.
- 40 Carlsson PO, Jansson L, Ostenson CG, Kallskog O. Islet capillary blood pressure increase mediated by hyperglycaemia in NIDDM GK rats. *Diabetes* 1997; **46**: 947–952.
- 41 Dimitrakoudis D, Vranic M, Klip A. Effects of hyperglycaemia on glucose transporters of the muscle: use of the renal glucose reabsorption inhibitor Phlorizin to control glycemia. *J Am Soc Nephrol* 1992; **3**: 1078–1091.
- 42 Dahlquist G. The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. *Acta Paediatr Suppl* 1998; **425**: 5–10.
- 43 Bono VH. Review of mechanism of action studies of the nitrosureas. *Cancer Treat Rep* 1976; **60**: 699–702.
- 44 Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low-doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 1998; **47**: 50–56.
- 45 Zahner D, Malaisse WJ. Kinetic behaviour of liver glucokinase in diabetes. I. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes Res* 1990; **14**: 101–108.
- 46 Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; **512**: 121–134.
- 47 Yang Z, Chen M, Fialkow LB, Ellet JD, Wu R, Nadler JL. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas* 2003; **26**: e99–104.
- 48 Mensah-Brown EP, Stosic Grujicic S, Maksimovic D, Jasima A, Shahin A, Lukic ML. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Mol Immunol* 2002; **38**: 941–946.
- 49 Muller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islet cells of C57/BL6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology* 2002; **205**: 35–50.
- 50 Holstad M, Sandler S. A transcriptional inhibitor of TNF- α prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice. *J Autoimmun* 2001; **16**: 441–447.
- 51 Zuccollo A, Navarro M, Frontera M, Cueva F, Carattino M, Catanzaro OL. The involvement of the kallikrein-kinin system in diabetes type 1 (insulinitis). *Immunopharmacology* 1999; **45**: 69–74.
- 52 Herold KG, Lenschow DJ, Bluestone JA. CD28/B7 regulation of autoimmune diabetes. *Immunol Res* 1997; **16**: 71–84.
- 53 Reddy S, Wu D, Elliott RB. Low dose streptozotocin causes diabetes in severe combined immunodeficient (SCID) mice without immune cell infiltration in the pancreatic islets. *Autoimmunity* 1995; **20**: 83–92.
- 54 Arata M, Fabiano de Bruno L, Goncalves Volpini WM, Quintans JC, D'Alessandro VG, Braun M *et al.* β -cell function in mice injected with mononuclear splenocytes from multiple-dose streptozotocin diabetic mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; **206**: 76–82.
- 55 Makino S, Kunimoto K, Munaoko Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. *Exp Anim* 1980; **29**: 1–13.
- 56 Atkinson M, Leiter EH. The NOD mouse model of insulin dependent diabetes: As good as it gets? *Nat Med* 1999; **5**: 601–604.
- 57 Todd JA. Genetic analysis of Type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **12**: 8560–8565.
- 58 Meagher C, Sharif S, Hussain S, Cameron MJ, Arreaza GA, Delovitch TL. Cytokines and chemokines in the pathogenesis of murine type 1 diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2003; **520**: 133–158.
- 59 Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay TW, Lee-Chan E *et al.* International workshop of lessons from animal models for human Type 1 diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral immunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 2001; **50**: 2451–2458.
- 60 Kay TW, Thomas HE, Harrison LC, Allison J. The β -cell in autoimmune diabetes: many mechanisms and pathways of loss. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**: 11–15.
- 61 Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 2001; **928**: 200–211.
- 62 Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated β -cell apoptosis. *Diabetologia* 2001; **44**: 2115–2133.
- 63 Nakhlooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic wistar rat. Metabolic and morphological studies. *Diabetes* 1977; **26**: 100–112.
- 64 Mordes JP, Bortell R, Groen H, Guberski DL, Rossini AA, Greiner DL. Autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. In: Sima, AAF, Shafir, E, eds. *Animal Models of Diabetes: a Primer*. Amsterdam: Harwood Academic, 2001: 1–41.
- 65 Bone AJ, Hitchcock PR, Gwilliam DJ, Cunningham JM, Barley J. Insulinitis and mechanisms of disease resistance: studies in an animal model of insulin dependent diabetes mellitus. *J Mol Med* 1999; **77**: 57–61.
- 66 Yoon JW, Jun SH, Santamaria P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of β -cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity* 1998; **27**: 109–122.
- 67 Rabinovicz A, Suarez-Pinzon W, El-Sheikh A, Sorensen O, Power RF. Cytokine gene expression in pancreatic islet-infiltrating leukocytes of BB rats: expression of Th1 cytokines correlates with β -cell destructive insulinitis and IDDM. *Diabetes* 1996; **45**: 749–754.
- 68 Lohr M, Markholst H, Dryberg T, Kloppel G, Oberholzel M, Lernmark A. Insulinitis and diabetes are preceded by a decrease in β cell volume in diabetes-prone BB rats. *Pancreas* 1989; **4**: 95–100.
- 69 Lally FJ, Ratcliff H, Bone AJ. Apoptosis and disease progression in the spontaneously diabetic BB/S rat. *Diabetologia* 2001; **44**: 320–324.
- 70 Mackay IR, Bone A, Tuomi T, Elliott R, Mandel T, Karopoulos C *et al.* Lack of autoimmune serological reactions in rodent models of insulin dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 1996; **9**: 705–711.
- 71 Yoon JW, Yoon CS, Lim HW, Huang QQ, Kang Y, Pyun KH *et al.* Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in β cells. *Science* 1999; **284**: 1183–1187.
- 72 Bortel R, Waite DJ, Whalen BJ, Todd D, Leif JH, Lesma E *et al.* Levels of Art2+ cells but not soluble Art2 protein correlate with expression of autoimmune diabetes in the BB rat. *Autoimmunity* 2001; **33**: 199–211.
- 73 Ramanathan S, Poussier P. BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes. *Immunol Rev* 2001; **184**: 161–171.
- 74 Martin AM, Blackenhorn EP, Maxson MN, Zhao M, Leif J, Mordes JP *et al.* Non-major histocompatibility complex-linked susceptibility loci on chromosome 4 and 13 in a backcross of the DP-BB/Wor rat to the WF rat. *Diabetes* 1999; **48**: 50–58.
- 75 Hashimoto L, Habita C, Beressi JP, Delepine M, Besse C,

- Cambon-Thomsen A *et al.* Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* 1994; **371**: 161–164.
- 76 Johnston CS, Monte WC. Infant formula ingestion is associated with the development of diabetes in the BB/Wor rat. *Life Sci* 2000; **66**: 1501–1507.
- 77 Paxson JA, Weber JG, Kulczycki A. Cow's milk-free diet does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1997; **46**: 1711–1717.
- 78 Malkani S, Nompoggi D, Hansen JW, Greiner DL, Mordes JP, Rossini A. Dietary cow's milk protein does not alter the frequency of diabetes in the BB rat. *Diabetes* 1997; **46**: 133–1140.
- 79 Simonson W, Ramanathan S, Beig S, Poussier P, Lernmark A. Protein-free diets do not protect high-incidence diabetes-prone BioBreeding rats from diabetes. *Metabolism* 2002; **51**: 569–574.
- 80 Cristen U, Benke D, Wolfe T, Rodrigo E, Rhode A, Hughes AC *et al.* Cure of prediabetic mice by viral infections involves lymphocyte recruitment along an IP-10 gradient. *J Clin Invest* 2004; **113**: 74–84.
- 81 Horwitz MS, Ilic A, Rodriguez E, Sarvetnick N. Coxsackievirus-mediated hyperglycaemia is enhanced by reinfection and this occurs independent of T cells. *Virology* 2003; **314**: 510–520.
- 82 Tracy S, Drescher KM, Chapman NM, Kim KS, Carson SD, Pirruccello S *et al.* Towards testing the hypothesis that group B coxsackieviruses (CVB) trigger insulin-dependent diabetes: inoculating non-obese diabetic mice with CVB markedly lowers diabetes incidence. *J Virol* 2002; **76**: 12097–12111.
- 83 Hyoty H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med* 2002; **34**: 138–147.
- 84 Jun JS, Yoon JW. The role of viruses in type 1 diabetes: two distinct cellular and pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. *Diabetologia* 2001; **44**: 271–285.
- 85 Chung YH, Jun HS, Son M, Bao M, Bae HY, Kang Y *et al.* Cellular and molecular mechanisms for Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in DR-BB rats. *J Immunol* 2000; **165**: 2866–2876.
- 86 Casteels KM, Mathieu C, Waer M, Valckx D, Overbergh L, Laureys JM *et al.* Prevention of Type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by late intervention with nonhypercalcemic analogues of 1,25 dihydroxyvitamin D3 in combination with a short induction course of cyclosporin A. *Endocrinology* 1998; **139**: 95–102.
- 87 Bone AJ, Walker R, Varey AM, Cooke A, Baird JD. Effect of cyclosporin on pancreatic events and development of diabetes in BB/Edinburgh rats. *Diabetes* 1990; **39**: 508–514.
- 88 McNerney MF, Pek SB, Thomas DW. Prevention of insulinitis and diabetes onset by treatment with complete Freund's adjuvant in NOD mice. *Diabetes* 1991; **40**: 715–725.
- 89 Sadelain MW, Qin HY, Sumoski W, Parfrey N, Singh B, Rabinovitch A. Prevention of diabetes in the BB rat by early immunotherapy using Freund's adjuvant. *J Autoimmun* 1990; **3**: 671–680.
- 90 Karounos DG, Bryson JS, Cohen DA. Metabolically inactive insulin analogue prevents type I diabetes in prediabetic NOD mice. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1344–1348.
- 91 Visser J, Klatter F, Vis L, Groen H, Strubbe J, Rozing J. Long-term prophylactic insulin treatment can prevent spontaneous diabetes and thyroiditis development in the diabetes-prone bio-breeding rat, while short-term treatment is ineffective. *Eur J Endocrinol* 2003; **149**: 223–229.
- 92 Elliott RB, Pilcher CC, Stewart A, Fergusson D, McGregor MA. The use of nicotinamide in the prevention of type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 1993; **696**: 333–341.
- 93 Schatz D, Gale EA, Atkinson MA. Why can't we prevent type 1 diabetes?: maybe it's time to try a different combination. *Diabetes Care* 2003; **26**: 3326–3328.
- 94 Stride A, Hattersley AT. Different genes, different diabetes. Lessons from maturity-onset diabetes of the young. *Ann Med* 2002; **34**: 207–216.
- 95 Krook A, O'Rahilly S. Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; **10**: 97–122.
- 96 Maassen JA, 'T Hart LM, Van Essen E, Heine RJ, Nijpels G, Jahangir Tafrechi RS *et al.* Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes* 2004; **53**: S103–S109.
- 97 Leibel RL, Chung WK, Chua SC. The molecular genetics of rodent single gene obesities. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31937–31940.
- 98 Chagnon YC, Bouchard C. Genetics of obesity: advances from rodent studies. *Trends Genet* 1996; **12**: 441–444.
- 99 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**: 425–432.
- 100 Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; **379**: 632–635.
- 101 Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CT *et al.* Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 1996; **13**: 18–19.
- 102 Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med* 1976; **119**: 85–90.
- 103 Mrialles F, Portha B. Early development of β -cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; **50**: S84–S88.
- 104 Galli J, Li LS, Glaser A, Ostenson CG, Jiao H, Fakhrai-Rad H *et al.* Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat Genet* 1996; **12**: 31–37.
- 105 Gauguier D, Froguel P, Parent V, Bernard C, Bihoreau MT, Portha B *et al.* Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat Genet* 1996; **12**: 38–43.
- 106 Galli J, Fakhrai-Rad H, Kamel A, Marcus C, Norgren S, Luthman H. Pathophysiological and genetic characterization of the major diabetes locus in GK rats. *Diabetes* 1999; **48**: 2463–2470.
- 107 Gill-Randall RG, Adams D, Ollerton RL, Alcolado JC. Is human Type 2 diabetes maternally inherited? Insights from an animal model. *Diabet Med* 2004; **21**: 759–762.
- 108 Janssen U, Phillips AO, Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes. *J Nephrol* 1999; **12**: 159–172.
- 109 Murakawa Y, Zhang W, Pierson CR, Brismar T, Ostenson CG, Efendic S *et al.* Impaired glucose tolerance and insulinopenia in the GK rat causes peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; **18**: 473–483.
- 110 Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Sekine Y, Honmura S, Matsuo K *et al.* Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia* 1997; **40**: 726–730.
- 111 Nakamura M, Yamada K. Studies on a diabetic (KK) strain of the mouse. *Diabetologia* 1967; **3**: 121–221.
- 112 Ikeda H. KK mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 1994; **24**: S313–316.
- 113 Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, Horikoshi S *et al.* Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type 2 model: is Zn- α 2-glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? *Diabetes* 2003; **52**: 2175–2181.
- 114 Shike T, Hirose S, Kobayashi M, Funabiki K, Shirai T, Tomino Y. Susceptibility and negative epistatic loci contributing to Type 2 diabetes and related phenotypes in a KK/Ta mouse model. *Diabetes* 2001; **50**: 1943–48.
- 115 Ueda H, Ikegami H, Yamato E, Fu J, Fukuda M, Shen G *et al.* The NSY mouse: a new animal model of spontaneous NIDDM with moderate obesity. *Diabetologia* 1995; **38**: 503–508.
- 116 Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Yamato E, Shibata M *et al.* Genetic analysis of late-onset type 2 diabetes in a mouse model of human complex trait. *Diabetes* 1999; **48**: 1168–1174.
- 117 Ziv E, Shafrir E, Kalman R, Galer S, Bar-On H. Changing pattern of prevalence of insulin resistance in *Psammomys obesus*, a model of nutritionally induced type 2 diabetes. *Metabolism* 1999; **48**: 1549–1554.

- 118 Marquie G, Hadjiisky P, Arnaud O, Duhault J. Development of macroangiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of gliclazide. *Am J Med* 1991; **90**: 55S–61S.
- 119 Cerasi E, Kaiser N, Gross DJ. From sand rats to diabetic patients: is non-insulin dependent diabetes mellitus a disease of the β cell? *Diabetes Metabol* 1997; **23**: 47–51.
- 120 Heled Y, Shapiro Y, Shani Y, Moran DS, Langzam L, Braiman L *et al*. Physical exercise prevents the development of type 2 diabetes mellitus in *Psammomys obesus*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **282**: E370–E375.
- 121 Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992; **41**: 1422–1428.
- 122 Kose H, Moralejo DH, Ogino T, Mizuno A, Yamada T, Matsumoto K. Examination of OLETF-derived non-insulin-dependent diabetes mellitus QTL by construction of a series of congenic rats. *Mamm Genome* 2002; **13**: 558–562.
- 123 Moralejo DH, Wei S, Wei K, Yamada T, Matsumoto K. X-linked locus is responsible for non-insulin-dependent diabetes in the OLETF rat. *J Vet Med Sci* 1998; **60**: 373–375.
- 124 Moralejo DH, Ogino T, Zhu M, Toide K, Wei S, Wei K *et al*. A major quantitative trait locus co-localizing with cholecystokinin type A receptor gene influences poor pancreatic proliferation in a spontaneously diabetogenic rat. *Mamm Genome* 1998; **9**: 794–798.
- 125 Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J *et al*. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J* 1996; **15**: 1542–1547.
- 126 Chang PY, Benecke H, Le Marchand-Brustel Y, Lawitts J, Moller DE. Expression of a dominant-negative mutant human insulin receptor in the muscle of transgenic mice. *J Biol Chem* 1994; **269**: 16034–16040.
- 127 Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Kagi T, Sakura H, Hayakawa T *et al*. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; **372**: 182–186.
- 128 Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S *et al*. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; **391**: 900–904.
- 129 Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R *et al*. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia. *Diabetes* 2000; **11**: 1880–1889.
- 130 Grupe A, Hutlgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic β cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* 1995; **83**: 69–78.
- 131 Liu ML, Gibbs EM, McCoid SC, Milici AJ, Stukenbrok HA, McPherson RK *et al*. Transgenic mice expressing the human GLUT4 muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11346–11350.
- 132 Silva JP, Kohler M, Graff C, Oldfors A, Magnuson MA, Berggren PO *et al*. Impaired insulin secretion and β -cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet* 2000; **26**: 336–340.
- 133 Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 1999; **96**: 329–339.
- 134 Okamoto H, Accili D. *In vivo* mutagenesis of the insulin receptor. *J Biol Chem* 2003; **278**: 28359–28362.
- 135 Rosen ED, Kulkarni RN, Sarraf P, Ozcan U, Okada T, Hsu CH *et al*. Targeted elimination of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in β cells leads to abnormalities in islet mass without compromising glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 7222–7229.
- 136 Minokoshi Y, Kahn CR, Kahn BB. Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 33609–33612.
- 137 Butler AA, LeRoith D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the IGF1 and IGF1R genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 2001; **145**: 1685–1688.
- 138 Van Assche FA, Aerts L, Holemans K. Metabolic alterations in adulthood after intrauterine development in mothers with mild diabetes. *Diabetes* 1991; **40**: 106–108.
- 139 Gill-Randall RJ, Adams D, Lewis M, Alcolado JC. Type 2 diabetes mellitus; genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm. *Diabetologia* 2004; **47**: 1354–1359.
- 140 Boloker J, Gertz SJ, Simmons RA. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes* 2002; **51**: 1499–1506.
- 141 Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, Hales CN. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2001; **2**: 139–143.
- 142 Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol* 2003; **547**: 11–20.
- 143 Reusens B, Remacle C. Intergenerational effect of an adverse intrauterine environment on perturbation of glucose metabolism. *Twin Res* 2001; **4**: 406–411.

DIRECTIVA DEL CONSEJO
de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales,
reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los
animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE)

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea y, en particular, su artículo 100,

Vista la propuesta de la Comisión (1),

Visto el dictamen del Parlamento Europeo (2),

Visto el dictamen del Comité Económico y Social (3),

Considerando que existen divergencias entre las leyes en vigor relativas a la protección de los animales utilizados para determinados fines de experimentación que podrían afectar el funcionamiento del mercado común;

Considerando que, con objeto de eliminar dichas divergencias, se debería proceder a la armonización de las leyes de los Estados miembros; considerando que tal armonización debería garantizar que el número de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos se reduzca al mínimo, que a dichos animales se les conceda la atención adecuada, que no se les cause dolor, sufrimiento, angustia o lesión permanente innecesariamente y que, en caso de no poderse evitar, estos perjuicios sean mínimos;

Considerando en particular que debe evitarse toda duplicación innecesaria de experimentos,

(1) DO N° C 351 de 31. 12. 1985, p. 16.

(2) DO N° C 255 de 13. 10. 1986, p. 250.

(3) DO N° C 207 de 18. 8. 1986, p. 3.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

El objetivo de la presente Directiva es el de garantizar, en el caso de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, la armonización de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros relativas a la protección de dichos animales, a fin de evitar que no se perjudique el establecimiento y el funcionamiento del mercado común, en particular mediante distorsiones de la competencia o barreras comerciales.

Artículo 2

A efectos de la presente Directiva se entenderá por:

- a) «animal», sin otro calificativo, cualquier ser vivo vertebrado no humano, incluidas las crías de vida propia y/o las formas de cría en reproducción, pero excluidos los fetos y las formas embrionarias;
- b) «animales de experimentación», los animales utilizados o destinados a ser utilizados en experimentos;
- c) «animales de cría», los animales especialmente criados para su utilización en experimentos en instalaciones aprobadas o registradas por la autoridad;

- d) «experimento», cualquier utilización de un animal para la experimentación y otro fin científico que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero, incluyendo, entre otros, los experimentos que, de manera intencionada o casual, puedan provocar el nacimiento de un animal en condiciones semejantes a las citadas, pero excluyendo los métodos menos dolorosos aceptados en la práctica moderna (i.e. métodos «humanos») para sacrificar o marcar a los animales; un experimento da comienzo cuando se empieza a preparar un animal para su utilización y acaba cuando ya no se va a hacer ninguna observación ulterior para dicho experimento; la eliminación del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero mediante la utilización satisfactoria de analgesia o anestesia u otros métodos no excluirá la utilización de un animal del ámbito de esta definición. Quedan excluidas las prácticas no experimentales, agrícolas o de clínica veterinaria;
- e) «autoridad», la autoridad o autoridades designadas por cada Estado miembro como responsables de la supervisión de los experimentos en el marco de aplicación de la presente Directiva;
- f) «persona competente», cualquier persona considerada por un Estado miembro competente para realizar las funciones contempladas en la presente Directiva;
- g) «establecimiento», cualquier instalación, edificio o grupo de edificios u otros locales y puede incluir un lugar que no esté totalmente cerrado o cubierto así como instalaciones móviles;
- h) «establecimiento de cría», cualquier instalación donde se críen animales para utilizarlos en experimentos;
- i) «establecimiento suministrador», cualquier establecimiento diferente de un criadero que suministre animales con vistas a su utilización en experimentos;
- j) «establecimiento usuario», cualquier establecimiento en el que los animales se utilicen para experimentos;
- k) «adecuadamente anestesiados», privados de sensaciones mediante métodos de anestesia (tanto local como general) que sean tan efectivos como aquellos empleados en una buena práctica veterinaria;
- l) «sacrificados con métodos humanos», el sacrificio de un animal con el mínimo de sufrimiento físico y mental, según las especies.

Artículo 3

La presente Directiva se aplicará a la utilización de animales en experimentos que se lleven a cabo para uno de los fines siguientes:

- a) el desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos, alimenticios y otras sustancias o productos, así como la realización de pruebas para comprobar su calidad, eficacia y seguridad:
- ii) para la prevención, profilaxis, diagnóstico o tratamiento de enfermedades, salud deteriorada u otras anomalías o sus efectos en el hombre, los animales o las plantas,
 - ii) la evaluación, detección, regulación o modificación de las condiciones fisiológicas en el hombre, los animales o las plantas;
- b) la protección del medio ambiente natural en interés de la salud o el bienestar del hombre o los animales.

Artículo 4

Cada Estado miembro garantizará que los experimentos en que se utilicen animales considerados en peligro de extinción de acuerdo con el Apéndice I del Convenio sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres y el Anexo C, parte 1 del Reglamento (CEE) N° 3626/82 (1) queden prohibidos a menos que se ajusten a lo dispuesto en el Reglamento citado y los objetivos del experimento sean:

- investigación tendente a la protección de las especies de que se trate, o
- fines biomédicos esenciales cuando se compruebe que tales especies son, excepcionalmente, las únicas adecuadas a tales fines;

Artículo 5

Los Estados miembros velarán por que, en lo que se refiere al cuidado general y al alojamiento de los animales:

- a) a cualquier animal de experimentación se deberá proporcionar alojamiento, un medio ambiente, al menos cierto grado de libertad de movimiento, alimentos, agua y cuidados adecuados a su salud y bienestar;
- b) se limitará absolutamente al mínimo cualquier restricción relativa al grado en que un animal de experimentación pueda satisfacer sus necesidades fisiológicas y etológicas.
- c) las condiciones ambientales en las que se críen, custodien o utilicen los animales de experimentación se verifiquen a diario.
- d) el bienestar y el estado de salud de los animales de experimentación sea observado por una persona competente para prevenir el dolor así como el sufrimiento, la angustia o el daño duradero inútiles;
- e) se dispongan medidas que garanticen que cualquier defecto o sufrimiento que se descubra sea eliminado lo más rápidamente posible.

Para la aplicación de las disposiciones de las letras a) y b), los Estados miembros prestarán atención a las líneas directrices establecidas en el Anexo II.

Artículo 6

1. Cada Estado miembro designará a la autoridad o a las autoridades responsables de verificar la aplicación apropiada de las disposiciones de la presente Directiva.
 2. En el marco de la aplicación de la presente Directiva, los Estados miembros adoptarán las medidas necesarias para que la autoridad designada, mencionada en el apartado 1, pueda recabar el consejo de los expertos competentes en relación con estos problemas.
- (1) DO N° L 384 de 31. 12. 1982, p. 1.

Artículo 7

1. Los experimentos sólo se realizarán por personas competentes autorizadas o bajo la responsabilidad directa de tales personas, o cuando el experimento u otro proyecto científico en cuestión se autorice con arreglo a las disposiciones de la legislación nacional.

2. N° deberá realizarse un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio, razonable y factible para obtener el resultado perseguido, y que no implique la utilización de un animal.

3. Cuando tenga que realizarse un experimento, la elección de las especies se considerará minuciosamente y, en su caso, se declarará a la autoridad. Al elegir entre diversos experimentos, se seleccionarán aquellos que utilicen el menor número de animales, que afecten a animales con el grado más bajo de sensibilidad neurofisiológica, que causen el menor dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero y que puedan proporcionar los resultados más satisfactorios.

N° podrán llevarse a cabo los experimentos con animales capturados en la naturaleza a menos que los experimentos con otros animales no sean suficientes para los objetivos del experimento.

4. Todos los experimentos deberán realizarse de forma que eviten la angustia y el dolor o el sufrimiento innecesario en los animales de experimentación. Deberán estar sujetos a las disposiciones previstas en el artículo 8. Las medidas establecidas en el artículo 9 deberán adoptarse en todos los casos.

Artículo 8

1. Todos los experimentos deberán llevarse a cabo con anestesia general o local.

2. El anterior apartado 1 no será de aplicación cuando:

a) se considere que la anestesia es más traumática para el animal que el experimento mismo;

b) la anestesia sea incompatible con los fines del experimento. En tales casos, se adoptarán las medidas legislativas y/o administrativas adecuadas para garantizar que no se realice innecesariamente el experimento.

La anestesia debería usarse en el caso de que se inflinjan lesiones graves que puedan causar dolores intensos.

3. Si la anestesia no fuera posible, deberían usarse analgésicos u otros métodos adecuados a fin de garantizar en la medida de lo posible que el dolor, el sufrimiento, la angustia o el daño queden limitados y que, en cualquier caso, el animal no sufra dolor, angustia o sufrimiento intenso.

4. Siempre que tal acción sea compatible con los fines del experimento, un animal anestesiado, que sufra dolor considerable después de haber sufrido la anestesia, deberá ser tratado a tiempo con medios para calmar el dolor o, cuando esto no sea posible, deberá ser sacrificado inmediatamente según métodos humanos.

Artículo 9

1. Al final de todo experimento, deberá decidirse si el animal debe mantenerse vivo o ser sacrificado mediante un método humano, teniéndose en cuenta que no se conservará con vida si, aun habiendo recuperado la salud normal en todos los demás aspectos, es probable que sufra un dolor o angustia duradero.

2. Las decisiones mencionadas en el apartado 1 serán adoptadas por una persona competente, preferiblemente un veterinario.

3. Cuando, al final de un experimento:

a) se vaya a conservar con vida un animal, éste deberá recibir el cuidado adecuado a su estado de salud, ser sometido a la vigilancia de un veterinario u otra persona competente y ser mantenido en las condiciones conformes a las exigencias del artículo 5. Sin embargo, las condiciones

establecidas en la presente letra podrán suspenderse cuando, en opinión de un veterinario, el animal no vaya a sufrir como consecuencia de tal suspensión;

b) no se vaya a conservar con vida a un animal o no pueda beneficiarse éste de las condiciones del artículo 5 relativas a su bienestar, deberá ser sacrificado, lo antes posible, mediante un método humano.

Artículo 10

Los Estados miembros deberán cerciorarse de que toda utilización repetida de los animales en experimentos es compatible con las disposiciones de la presente Directiva.

En particular, no deberá utilizarse un animal más de una vez en los experimentos que entrañen un dolor intenso, angustia o sufrimiento equivalente.

Artículo 11

Nº obstante las demás disposiciones de la presente Directiva, cuando se haga necesario para los fines legítimos del experimento, la autoridad podrá permitir que el animal afectado sea puesto en libertad, siempre que se haya satisfecho la adopción del máximo cuidado posible para salvaguardar el bienestar del animal, en la medida en que su estado de salud lo permita y que no haya peligro para la salud pública y el medio ambiente.

Artículo 12

1. Los Estados miembros deberán establecer procedimientos con arreglo a los cuales se notifiquen anticipadamente a la autoridad los experimentos mismos o los datos relativos a las personas que los efectúen.

2. Cuando se vaya a someter a un animal a un experimento en el que sufra o pueda sufrir un intenso dolor que pueda prolongarse, este experimento tendrá que ser específicamente declarado a la autoridad y justificado o específicamente autorizado por ella. La autoridad adoptará las medidas judiciales o administrativas oportunas cuando la importancia del experimento para satisfacer necesidades esenciales del hombre o de los animales no esté suficientemente demostrada.

Artículo 13

1. Basándose en las solicitudes de autorización y en las notificaciones recibidas, y de acuerdo con los informes elaborados, la autoridad en cada Estado miembro recogerá y, en la medida de lo posible, publicará periódicamente la información estadística sobre la utilización de animales en experimentos con respecto a:

a) el número y las especies de animales utilizados en los experimentos;

b) el número de animales, por categorías seleccionadas, utilizados en los experimentos mencionados en el artículo 3;

c) el número de animales, por categorías seleccionadas, utilizados en los experimentos exigidos por la legislación.

2. Los Estados miembros adoptarán todas las medidas necesarias para garantizar la protección del carácter confidencial de las informaciones que presenten un interés comercial particular que se comuniquen conforme a la presente Directiva.

Artículo 14

Las personas que lleven a cabo experimentos o tomen parte en ellos y las personas que estén al cuidado de animales utilizados en experimentos, incluyendo las tareas de supervisión, deberán tener la preparación y formación apropiadas.

En particular, las personas que lleven a cabo o supervisen la realización de experimentos deberán haber recibido formación en una disciplina científica relacionada con el trabajo experimental que se realice y deberán ser capaces de tratar y estar al cuidado de animales de laboratorio; deberán también certificar que han alcanzado un nivel suficiente de formación para llevar a cabo dichas tareas.

Artículo 15

Los establecimientos de cría y los establecimientos suministradores deberán ser aprobados o registrados por la autoridad y deberán ajustarse a lo dispuesto en los artículos 5 y 14, salvo que se haya hecho una excepción de acuerdo con el apartado 4 del artículo 19 o el artículo 21. Un establecimiento suministrador sólo podrá obtener animales a partir de establecimientos de cría o de otros establecimientos suministradores, a no ser que el animal haya sido legalmente importado y no sea salvaje o vagabundo. Podrá hacerse una excepción, general o particular, a esta última disposición, para un establecimiento suministrador, conforme a las modalidades que determine la autoridad.

Artículo 16

La aprobación o el registro contemplados en el artículo 15 indicarán la persona competente responsable del establecimiento encargado de administrar u organizar la administración de un cuidado apropiado de los animales criados o mantenidos en el establecimiento y de garantizar la conformidad con lo dispuesto en los artículos 5 y 14.

Artículo 17

1. Los establecimientos de cría y los establecimientos suministradores deberán anotar el número y la especie de animales vendidos o suministrados, la fecha de venta o de suministro, el nombre y dirección del destinatario y el número y especie de los animales muertos durante su estancia en el establecimiento de cría o en el establecimiento suministrador en cuestión.

2. Cada autoridad determinará qué registros deberá conservar y tener a su disposición la persona responsable del establecimiento mencionado en el apartado 1; dichos registros deberán conservarse durante al menos tres años a partir de la fecha de la última inscripción y deberán someterse a inspección periódica a cargo de los funcionarios que designe la autoridad.

Artículo 18

1. Todo perro, gato o primate no humano de cualquier establecimiento de cría, establecimiento suministrador o establecimiento usuario deberá contar, antes de su destete, con una marca de identificación individual realizada de forma que cause el menor daño posible, excepto en los casos contemplados en el apartado 3.
2. Cuando un perro, gato o primate no humano no marcado sea llevado a un establecimiento por primera vez tras su destete, deberá ser marcado lo antes posible.
3. Cuando un perro, gato o primate no humano sea trasladado de un establecimiento de los que se citan en el apartado 1 a otro establecimiento, antes de su destete, y no sea posible marcarlo previamente, el establecimiento receptor deberá conservar un registro documental completo, con indicación, en particular, de los datos de la madre, hasta que sea marcado.
4. Deberán incluirse en los registros de cada establecimiento los detalles particulares relativos a la identidad y origen de todo perro, gato o primate no humano.

Artículo 19

1. Los establecimientos usuarios deberán estar registrados o aprobados por la autoridad. Se harán las adaptaciones oportunas para que los establecimientos usuarios tengan las instalaciones y el equipo apropiado para las especies de animales que se utilicen y para la ejecución de los experimentos que allí se lleven a cabo; su proyecto, construcción y método de funcionamiento deberán garantizar que los experimentos puedan ejecutarse con la mayor efectividad posible, de forma que se obtengan resultados coherentes con el menor número posible de animales y se produzca el mínimo grado de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero.
2. En cada establecimiento usuario:
 - a) deberán mencionarse el nombre de la persona o personas que sean responsables administrativamente del cuidado de los animales y del funcionamiento del equipo;
 - b) deberá disponerse de personal cualificado y en número suficiente;
 - c) se tomarán las disposiciones oportunas para que se pueda contar con asesoramiento y tratamiento veterinarios;
 - d) se encargará a un veterinario o a otra persona competente de tareas de asesoramiento en relación con el bienestar de los animales.
3. Podrán llevarse a cabo experimentos fuera de los establecimientos usuarios con autorización de la autoridad.
4. En los establecimientos usuarios, sólo se utilizarán animales procedentes de establecimientos de cría o de establecimientos suministradores, salvo excepción, general o particular, concedida según las modalidades que determine la autoridad. Siempre que sea posible se deberán utilizar animales de cría. No se utilizarán en los experimentos los animales vagabundos de especies domésticas. Una excepción general que se haga conforme a las condiciones del presente apartado no podrá extenderse a los perros y gatos vagabundos.
5. Los establecimientos usuarios deberán conservar el registro de todos los animales utilizados y deberán presentarlos siempre que la autoridad lo requiera. En particular, en dichos registros deberá constar el número y especie de todos los animales adquiridos, dónde fueron adquiridos y la fecha de su llegada. Dichos registros deberán conservarse al menos tres años y deberán ser

presentados a la autoridad que así lo solicite. Los establecimientos usuarios deberán estar sujetos a inspecciones periódicas a cargo de los representantes de la autoridad.

Artículo 20

Cuando los establecimientos usuarios críen animales para su uso en sus propias instalaciones, sólo será necesario un registro o aprobación a los fines de los artículos 15 y 19. No obstante, los establecimientos deberán ajustarse a las disposiciones pertinentes de la presente Directiva en lo que se refiere a los establecimientos de cría y a los establecimientos usuarios.

Artículo 21

Los animales que pertenezcan a las especies enumeradas en el Anexo I destinados a la utilización en experimentos deberán ser animales de cría, a no ser que se haya obtenido una excepción general o especial, conforme a las modalidades que determine la autoridad.

Artículo 22

1. Con objeto de evitar duplicaciones innecesarias de experimentos que tengan como fin cumplir las disposiciones de las legislaciones nacionales o comunitarias en materia de salud y seguridad, los Estados miembros deberán reconocer, en la medida de lo posible, la validez de los datos obtenidos mediante los experimentos llevados a cabo en el territorio de otro Estado miembro, a no ser que alguna prueba posterior sea necesaria para la protección de la salud pública y la seguridad.
2. A tal fin, los Estados miembros, cuando sea factible y sin perjuicio de lo dispuesto en las directivas comunitarias existentes, deberán proporcionar información a la Comisión sobre su legislación y procedimientos administrativos relativos a experimentos con animales, con inclusión de los requisitos que haya que cumplir antes de la comercialización de los productos; deberán también aportar información objetiva sobre los experimentos realizados en su territorio y sobre las autorizaciones y demás detalles administrativos relacionados con dichos experimentos.
3. La Comisión creará un Comité consultivo permanente en el que estarán representados los Estados miembros y que asistirá a la Comisión en la organización del intercambio de informaciones apropiadas, velando por la confidencialidad de las informaciones, y que asistirá igualmente a la Comisión en lo que respecta a los demás asuntos que se derivan de la aplicación de la presente Directiva.

Artículo 23

1. La Comisión y los Estados miembros deberán fomentar la investigación sobre el desarrollo y la confirmación de técnicas alternativas que puedan aportar el mismo nivel de información que el obtenido en experimentos con animales, que supongan el uso de menos animales o que impliquen procedimientos menos dolorosos, y darán los pasos oportunos, en la medida en que lo consideren apropiado, para fomentar la investigación en este campo. La Comisión y los Estados miembros seguirán de cerca la evolución de los métodos experimentales.

2. La Comisión informará, antes de finalizar 1987, sobre la posibilidad de modificar las pruebas y orientaciones establecidas en la legislación comunitaria existente, teniendo en cuenta los objetivos contemplados en el apartado 1.

Artículo 24

La presente Directiva no limitará el derecho de los Estados miembros a aplicar o adoptar medidas más estrictas para proteger a los animales utilizados en experimentos, o para controlar o limitar la utilización de animales en experimentos. En particular, los Estados miembros podrán solicitar una autorización previa para experimentos o programas de trabajo que notifiquen de acuerdo con el apartado 1 del artículo 12.

Artículo 25

1. Los Estados miembros tomarán las medidas necesarias para dar cumplimiento a la presente Directiva a más tardar el 24 de noviembre de 1986. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Los Estados miembros comunicarán a la Comisión las disposiciones de la legislación nacional que adopten en el campo que abarca la presente Directiva.

Artículo 26

Con intervalos regulares que no superen los tres años, y por primera vez cinco años después de la notificación de la presente Directiva, los Estados miembros informarán a la Comisión de las medidas que se hayan tomado en este campo y presentarán el correspondiente resumen de la información recogida conforme al artículo 13; la Comisión preparará un informe para el Consejo y para el Parlamento Europeo.

Artículo 27

Los destinatarios de la presente Directiva son los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 24 de noviembre de 1986.

Por el Consejo

El Presidente

W. WALDEGRAVE