



ANEXO I: PROTOCOLOS DE SUPERVISIÓN EN PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN CON PECES

INTRODUCCIÓN Y CONSIDERACIONES GENERALES

El empleo de animales en proyectos de investigación requiere asegurar que su entorno sea adecuado para la especie elegida. En particular, en el caso de los peces esto incluye el tamaño y la densidad de animales en el tanque, el control de la temperatura, la iluminación y el fotoperíodo. Los peces serán alimentados conforme a una pauta nutricional adecuada para su especie y etapa de desarrollo, garantizando tanto el cumplimiento de los objetivos del proyecto como su bienestar. Adicionalmente, se realizarán cambios de agua parciales semanalmente cuando el circuito sea cerrado y se regulará la renovación de agua en el caso de circuitos abiertos.

Respecto a la supervisión del bienestar en peces, deben emplearse métodos no invasivos. El pesado de los animales, por ejemplo, puede ser contraproducente y generar problemas de bienestar asociados a la manipulación ya que los peces deberán ser anestesiados y extraídos del agua.

Así, es preciso realizar observaciones regulares de los indicadores de bienestar de los animales como la apariencia física, el comportamiento y la salud general. Complementariamente, es necesario controlar y medir regularmente la calidad del agua, incluyendo la temperatura, concentración de oxígeno, pH y concentración de amonio, nitritos y nitratos, de acuerdo a las necesidades específicas de cada especie.

Las observaciones realizadas deben documentarse, permitiendo de esta manera un seguimiento a largo plazo del bienestar de los peces y la detección temprana de problemas.

Igualmente, será necesario revisar y actualizar los protocolos de supervisión en función de los resultados de nuevas investigaciones y evidencias de mejores prácticas.

Por último, las instituciones, los Comités de Ética en Experimentación Animal y las personas que desarrollan proyectos investigación con peces, deben fomentar el respeto y la comprensión de su bienestar.

En el presente documento, Anexo I que se integra en **“La tercera R: Refinamiento. Protocolos de supervisión en experimentación animal”** elaborado por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU), CEEA-EHU, se detallan (1) un protocolo genérico para la supervisión de peces, así como la definición de criterios de punto final, así como (2) un protocolo específico para la supervisión de pez cebra y la definición de criterios de punto final.

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN Y CRITERIOS DE PUNTO FINAL GENÉRICOS PARA PECES

La manera más efectiva para asegurar el bienestar de los peces es mantener unas condiciones óptimas de cultivo óptimas para cada especie. Para ello, es necesario la monitorización de la **concentración de oxígeno** (mantener por encima de 6 mg/L) y de **compuestos nitrogenados** (amonio y nitrito a 0 mg/L y nitrato por debajo de 50 mg/L). Según el tipo de sistema de cultivo, flujo abierto o sistema de recirculación acuícola -RAS-, estos parámetros se controlarán aumentando o disminuyendo el flujo de agua y la aireación del tanque o bien cambiando el agua y/o revisando el estado del filtro biológico (si el problema persiste y los cambios de agua resultan insuficientes), respectivamente.

Observar que el protocolo propuesto es genérico y requerirá adaptaciones en función del experimento concreto. Por ejemplo, en el caso de experimentos de toxicología, hay tóxicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que tienen un efecto narcótico sobre los peces que puede manifestarse tras la administración del tratamiento. Sin embargo, a medida que va disminuyendo la concentración en agua por evaporación o los peces los van metabolizando, los animales se van recuperando. En ese caso convendría establecer una pauta temporal, teniendo en cuenta la persistencia de los síntomas o el empeoramiento con el tiempo.

Asimismo, una complejidad en la experimentación con peces es que muchas veces los animales no están identificados individualmente y puede haber bastantes en un mismo tanque, con lo cual es difícil hacer un seguimiento individualizado.

La supervisión de los parámetros relativos al bienestar de los animales, así como el control de las condiciones de cultivo se realizará **diariamente** desde el inicio del experimento hasta el final, coincidiendo con la alimentación de los animales. Se mantendrá un registro de supervisión diario.

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN GENERAL PARA PECES

Los parámetros a evaluar incluirán:

Parámetro	Puntuación
Apariencia física	
Normal	0
Heridas cutáneas o daño en las aletas	1
Consumo de alimento	
Normal	0
Sin respuesta a la alimentación durante 1 día	1
Sin respuesta a la alimentación durante 2 días	2
Natación	
Natación en la columna de agua	0
Natación errática	1
Pérdida parcial o total del equilibrio	1
Actividad	

Normal	0
Boqueo anormal en la superficie del agua	1
Falta de respuesta a estímulos como la presencia del investigador	1

Valoración: Cualquier pez con una puntuación de 1 ó más será retirado del experimento.

CRITERIOS DE PUNTO FINAL GENERALES PARA PECES

La simple observación de la ocurrencia de alguno de los parámetros de bienestar animal previamente mencionados dará lugar al punto final. El procedimiento para eutanasia consiste en una sobredosis de anestésico (como, por ejemplo, triclaína -MS-222-). La dosis y tiempo de exposición deberán adecuarse a las características de la especie. Se debe de reconocer la muerte del animal por el cese de la respiración (movimiento opercular) y del latido cardíaco.

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN Y CRITERIOS DE PUNTO FINAL PARA PEZ CEBRA

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN PARA PEZ CEBRA

En el caso específico del pez cebra se recomiendan las siguientes condiciones de cultivo [1] para garantizar el bienestar de los animales:

- **Fotoperiodo:** 14/10 ó 12/12 h, nivel de iluminación constante.
- **Temperatura:** entre 24 y 29 °C, con una temperatura óptima de 28 °C.
- **Conductividad:** entre 150 y 1700 µS/cm.
- **Dureza del agua:** entre 40 y 250 mg/L CaCO₃.
- **pH:** entre 6.5 y 8.
- **Compuestos nitrogenados:** NH₃/NH₄⁺ <0.1 mg/L, NO₂⁻ <0.3 mg/L, NO₃⁻ <25 mg/L.
- **Oxígeno disuelto:** >5 mg/L.
- **Densidad:** 5 individuos adultos por litro, hasta un máximo de 10 individuos adultos por litro. No se recomienda la presencia de menos de 5 animales por tanque por un periodo prolongado de tiempo.
- **Ruido:** tan bajo como sea posible, sin cambios bruscos ni vibraciones

Además, algún tipo de enriquecimiento (social, visual o nutricional) puede contribuir al disminuir el estrés en los animales.

Para la supervisión de pez cebra, que se llevará a cabo coincidiendo con los momentos de alimentación, se describe a continuación el protocolo propuesto por Martins y colaboradores en 2016 [2] con adaptaciones menores. Este protocolo puede ser adaptado considerando las especificidades de los distintos procedimientos experimentales.

Parámetro	Puntuación
Apariencia física*	
Normal	0
Ausencia repetida de opérculo y aletas, lo que indica posibles comportamientos antagonistas; oscurecimiento/inflamación de la aleta	1
Escoliosis/lordosis leve, lesiones en el tegumento, producción de moco, sobre o subcondición (obesidad o delgadez), cambio brusco de color, especialmente palidez	2
Emaciación general (baja proporción cuerpo-cabeza), deformidades corporales generales, escamas ausentes o protuberantes	3
Consumo de alimento	
Normal	0
Sin respuesta a la alimentación durante 1 día	1
Sin respuesta a la alimentación durante 2 días, incluso alimento vivo	2
Sin respuesta a la alimentación durante 3 días, incluso alimento vivo como artemia o rotíferos**	3
Respiración	
Normal	0
Respiración entrecortada o agónica o tasa extremadamente baja, casi sin movimiento opercular	3

Natación**	
Natación en la columna de agua	0
Dificultades para controlar la flotabilidad y/o mantener el equilibrio	2
Natación sistemática en la superficie o en el fondo del tanque	3
Actividad	
Normal	0
Hiperactividad (natación errática) o hipoactividad	2
Letargo, sin reacción a estímulos externos	3
Comportamiento social**	
Normal, agrupamiento	0
Aislamiento cuando el alojamiento es en grupo	1
Individuo siempre persiguiendo o siendo perseguido por congéneres	2
Sin respuesta a los comportamientos de sus congéneres hacia sí mismo	3

Valoración: 0-1: normal; 2-8: incrementar la frecuencia de la supervisión. Considerar tratamiento veterinario, incluyendo analgésicos, y analizar la calidad del agua; 9-12: sufrimiento, consultar al veterinario especializado, considerar la eutanasia; 13-18: estado grave, eutanasia, reconsiderar el procedimiento experimental.

CRITERIOS DE PUNTO FINAL PARA PEZ CEBRA

Se puede considerar la eutanasia si se observa una puntuación de 3 en cualquiera de las categorías del protocolo de supervisión, excepto en las categorías relacionadas con el comportamiento (**), en las que una puntuación de 3 requiere una observación minuciosa y repetida para tomar una decisión final sobre la eutanasia. (*) Tener en cuenta la edad de los animales [2].

El procedimiento utilizado mayoritariamente para la eutanasia de peces cebras consiste en una sobredosis de triclaína (MS-222) a una concentración >200 mg/L en la que los peces deben permanecer al menos hasta 10 minutos después del cese del movimiento opercular [1]. Debido a su naturaleza ácida, el MS-222 debe ser tamponado para su uso [2]. También se utiliza habitualmente benzocaína a una concentración >250 mg/L [1]. El shock hipotérmico también se considera un método de eutanasia adecuado para el pez cebra. Este método implica un cambio repentino de temperatura de al menos 20 °C: desde los aproximadamente 28 °C del cultivo a agua helada (<4 °C) en la que los peces deben permanecer al menos 5 minutos evitándose el contacto directo con hielo [1]. Además, se puede considerar una combinación de ambos métodos: inmersión del animal en una solución de triclaína tamponada (100 mg/L) a 28 °C como analgésico seguido de una inmersión del animal en una solución de triclaína tamponada (>200 mg/L) a <4 °C como eutanasia.

BIBLIOGRAFÍA

[1] SCHEER (Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks), Opinion on the Revision of Annexes III and IV of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes regarding accommodation parameters and methods of killing for zebrafish, and accommodation parameters for Passerine birds, adopted on 25 September 2023. (https://health.ec.europa.eu/publications/scheer-revision-annexes-iii-and-iv-directive-201063eu-protection-animals-used-scientific-purposes_en)

[2] Martins T, Valentim AM, Pereira N, Antunes LM (2016) Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: a question of refinement. *Lab Anim.* 50(6):476-488. doi: 10.1177/0023677216670686.