

ANEXO VII

Resumen no técnico		
Título del Proyecto	Estudio de las respuestas fisiológicas y del desarrollo de larvas de anfibios frente a estímulos ambientales	
Duración del proyecto	5 años	
Palabras clave (max. 5)	Desarrollo larvario, respuestas antidepredatorias, anfibios	
Finalidad del proyecto (Artículo 5)	Investigación básica	X
	Investigación traslacional o aplicada	
	Desarrollo y fabricación de prod. farmacéuticos, alimentos, piensos y otras sustancias o productos, así como la realización de pruebas para comprobar su calidad, eficacia y seguridad	
	Protección del medio natural en interés de la salud o el bienestar de los seres humanos o los animales	
	Investigación dirigida a la conservación de las especies	
	Enseñanza superior o formación para la adquisición o mejora de las aptitudes profesionales	
	Medicina legal y forense	
	Mantenimiento de colonias o animales genéticamente modificados, no utilizados en otros procedimientos	
Descripción de los objetivos (ej.: aclaración de cuestiones científicas o resolución de necesidades clínicas)	El objetivo es comprender las diferencias entre especies en sus niveles basales de hormonas glucocorticoides y su papel en la respuestas antidepredatorias. Para ello criaremos larvas de las distintas especies en presencia o ausencia de pistas químicas de depredador y a distintos niveles de corticosterona, determinando los cambios fenotípicos inducidos y su base fisiológica y genética.	
¿Cuáles son los beneficios potenciales que se esperan de este proyecto? (avances científicos previstos o manera en que las personas/animales se pueden beneficiar del proyecto)	Adquirir conocimiento sobre las respuestas comportamentales, fisiológicas y genéticas de vertebrados a variaciones ambientales, que pueden ser claves a la hora de comprender y modelizar respuestas a cambio global	
¿Qué especies y nº aprox. se espera utilizar?	<i>Pelobates cultripes</i> , <i>Pelophylax perezi</i> , <i>Hyla meridionalis</i> , <i>Pelodytes ibericus</i> , <i>Discoglossus galganoi</i> , <i>Alytes cisternasii</i> , <i>Rana temporaria</i> , <i>Bufo spinosus</i> , <i>Epidalea calamita</i> , <i>Bombina variegata</i> , <i>Xenopus laevis</i> . Esperamos utilizar un máximo de 700 larvas por especie (730 en el caso de <i>Pelobates cultripes</i>).	
Teniendo en cuenta lo que se va a hacer con los animales, ¿qué efectos adversos se esperan, qué grado de severidad es más probable y cuál será el destino de los animales?	Se mantendrán las larvas individualmente o en grupos reducidos en cubos de entre 1 y 10 L. Se alimentarán con una mezcla de espinacas hervidas y pienso de conejo. Se inducirán cambios en la tasa de crecimiento y desarrollo mediante inducción ambiental y manipulación hormonal. El grado de severidad es entre leve y moderado y el destino de los animales es la eutanasia.	
Application de las 3R		
1. Reemplazo Explique porqué se necesita el uso de animales y porqué no se pueden utilizar métodos alternativos	No existen métodos alternativos porque el estudio de esta especie es el objetivo en si mismo.	
2. Reducción Explique cómo se asegura la utilización de un nº mínimo de animales.	P1: El número de individuos contemplado para los experimentos de exposición a depredadores y riesgo de desecación se basa en trabajos propios previos que indican que puede ser un tamaño muestral reducido pero suficiente para detectar diferencias inducidas por los tratamientos, sobre todo para especies con gran capacidad de respuesta fenotípica durante su desarrollo larvario, como <i>Pelobates cultripes</i> (Gomez-Mestre et al 2013 PLoS One 8: e84266; Burraco et al 2015 Current Zool 61: 835-845; Kulkarni et al. 2017 Nature Comm 8(1): 1-7). Otras especies incluidas en este procedimiento como <i>E. calamita</i> , <i>B. spinosus</i> o <i>D. galganoi</i> muestren un grado de plasticidad mucho menor (Richter-Boix, A., Llorente, G. A., &	

	<p>Montori, A. (2006). A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. <i>Evolutionary Ecology Research</i>, 8(6), 1139-1154) y haga falta un número de individuos mayor por tratamiento para asegurarnos de que podemos hacer un test robusto de la existencia o no de respuestas. Si cruzamos tres niveles de agua (alto, medio y bajo) con presencia/ausencia de pistas químicas de depredador tendremos 6 tratamientos. Asignaremos 50 larvas de cada especie a cada uno de esos tratamientos para un total de 300 larvas por especie. Una vez eutanasiadas las larvas, asignaremos 10 réplicas de cada tratamiento a cada uno de los cinco objetivos distintos de investigación funcional: determinación de niveles de hormona, determinación de estrés oxidativo, inmunohistoquímica, transcriptómica y epigenética.</p> <p>P2: El número de individuos contemplado para los experimentos de manipulación hormonal se basa en el uso de 10 réplicas por tratamiento (Burraco et al 2013 <i>Current Zoology</i> 59: 475-484; Burraco et al 2015 <i>Current Zool</i> 61: 835-845; Florencio et al. 2020 <i>Comp Biochem Physiol</i>: 110654), estableciendo un gradiente de cinco concentraciones para cada uno de los dos compuestos (corticosterona y metirapona). En total, necesitamos 2 compuestos X 5 concentraciones x 10 réplicas.</p> <p>P3: El número de individuos contemplado corresponde al máximo que podríamos llegar a tener que utilizar si tuviéramos 10 depredadores alimentados con larvas de cada especie de anfibio durante 1 mes. El agua generada por los eventos de depredación durante ese tiempo puede ser congelada y sería suficiente para proveer de las pistas químicas necesarias durante todo el periodo larvario de las distintas especies de anfibios. Las especies con un desarrollo más largo también alcanzan un mayor tamaño, por lo que la cantidad de señal química que se vierte al agua es mayor. Por este motivo, para las especies de largo periodo larvario podemos alimentar a los depredadores con menor frecuencia y así reducir el número de individuos asignados a este procedimiento. En el caso de <i>P. cultripes</i> se han añadido 30 larvas más para una prueba de refinamiento que se detalla a continuación.</p>
<p>3. Refinamiento Explique en función de qué se ha elegido el tipo de especies y porqué el modelo o modelos utilizado son los más adecuados en cuanto al Refinamiento, teniendo en cuenta los objetivos científicos. Explique también las medidas legales que se van a tomar para minimizar los daños al bienestar de los animales.</p>	<p>P1: Los animales se mantendrán individualizados minimizando la probabilidad de contagio y evitando la agresión o competencia. Las cámaras climáticas se limpian y desinfectan al término de cada uso, para garantizar su asepsia. La dieta de las larvas se irá variando, mezclando en distintas proporciones pienso de conejo con espinacas hervidas o kale, y macrófitos acuáticos de los que se alimentan a menudo en el medio natural. Esta variación temporal en la composición de la dieta permitirá romper la rutina durante el mantenimiento de los animales. Además, se incorporará el siguiente protocolo de enriquecimiento ambiental:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Las larvas serán alimentadas tres veces por semana, alterando los días de manera que sea L, X, V ó M, J, S, dependiendo de la semana. - La alimentación base será pienso de conejo molido, pero a veces se les proporcionará molido y a veces en forma de 'pellet' para que lo roan. <p>Todas las semanas se les proporcionará además espinacas congeladas que se hervirán durante un par de minutos para facilitar el consumo de sus hojas (previamente se dejan enfriar).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Los contenedores experimentales se reubicarán una o dos veces por semana, cambiándolos de balda o de posición dentro de la balda (fondo o frente). Esto hará variar la cantidad de luz que reciben y su exposición al estímulo de las personas que entramos en la cámara climática. <p>P2: Los animales se mantendrán individualizados reduciendo al mínimo la probabilidad de contagio y evitando la agresión o competencia. Las cámaras climáticas se limpian y desinfectan al término de cada uso, para garantizar su asepsia. La dieta de las larvas</p>

se irá variando, mezclando en distintas proporciones pienso de conejo con espinacas hervidas o kale, y macrófitos acuáticos de los que se alimentan a menudo en el medio natural. Esta variación temporal en la composición de la dieta permitirá romper la rutina durante el mantenimiento de los animales. Como la exposición a corticosterona puede causar niveles de estrés crónico, se ha reducido la duración del procedimiento con respecto al P1. Se aplicará también el protocolo de enriquecimiento ambiental descrito más arriba.

P3: Los animales se mantendrán en contenedores de 10 L en los que las densidades serán ajustadas al tamaño de las larvas, variando entre 10 larvas por litro para especies de reducido tamaño como *E. calamita*, *B. spinosus* o *D. galganoi*, y de 2,5 por litro en especies más grandes como *A. cisternasii* o *P. cultripes*, conforme a lo indicado en el Anexo II del RD 53/2013. Se les aplicará el protocolo de enriquecimiento indicado para P1.

Para averiguar si podemos anestésiar a las larvas de anfibios antes de permitir que sean depredadas haremos un experimento piloto para evaluar la posibilidad de anestésiar a las larvas de anfibios antes de ser expuestas a depredación. Para ello utilizaremos 5 depredadores (*Anax* ó *Dytiscus*), a los que se permitirá consumir a cada uno 2 larvas de *P. cultripes*, una anestésiada y la otra no. La depredación sobre estas larvas se realizará con al menos 2 días de distancia entre un evento y otro, y se renovará el agua entre eventos. Colectaremos agua de cada uno de los depredadores y las mezclaremos por tipo de presa (anestésiada o no) y compararemos la capacidad de inducción fenotípica de ambos stocks de agua. Para ello expondremos a 10 larvas individualizadas de *P. cultripes* a alícuotas de agua de cada uno de los stocks durante una semana. Esta prueba de refinamiento requerirá 30 larvas adicionales.

Es probable que esta medida de refinamiento no funcione porque estando anestésiadas las larvas de anfibios pueden no emitir las señales de alarma, y que los depredadores sean a su vez sensibles a la anestésia absorbida por los renacuajos. Si esta opción no funcionara, se permitiría el acceso de los depredadores a las larvas de anfibios sin anestésia previa, lo que no constituye un procedimiento artificial cruel, sino que en realidad refleja un proceso natural rutinario en la naturaleza.