

CURSO-TALLER DE REDUCCIÓN, REFINAMIENTO Y REEMPLAZO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y DOCENCIA

SESIÓN 1: APERTURA E INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN A LAS 3R.

Argelia Castaño. CISA - INIA. Madrid. Presidenta de REMA- Miembro del Comité Científico Asesor del Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos-ESAC-ECVAM.

Hablar de alternativas a los animales de experimentación implica necesariamente referirse a Russel y Burch y a su libro *The Principles of Humane Experimental Technique* (1959), donde se estableció el principio de las 3Rs.

R de reducción, aplicando un correcto diseño estadístico que permita utilizar sólo el número de animales necesario para obtener una información fiable y precisa. Tan inadecuado resulta un procedimiento experimental que utiliza más animales de los necesarios, como el que utiliza tan pocos que sus resultados no proporcionan la calidad científica exigible, y que a la larga resultan inútiles por no ser fiables.

R de refinamiento, entendido éste como cualquier sistema que permita disminuir la severidad del daño infligido a los animales todavía imprescindibles para muchos procedimientos. Actualmente la utilización de técnicas no invasivas, como por ejemplo la resonancia magnética, permiten eliminar o reducir el dolor, además del número de animales; pues con ellas cada animal actúa como su propio control, incrementando la calidad de los resultados científicos.

Finalmente, R de reemplazo de los vertebrados por cualquier otro método que emplee material no sensitivo. Entendiendo por material no sensitivo, desde los modelos computacionales hasta los ensayos *in vitro* con modelos celulares, o los ensayos con organismos menos evolucionados como microorganismos, plantas e invertebrados, cuya capacidad para sentir dolor está reducida al máximo, debido en unos casos a la carencia de sistema nervioso y en otros, al menor desarrollo de sus sistemas sensoriales. Los modelos *in vitro* en investigación básica son los modelos utilizados de manera rutinaria. La mayor parte de la investigación biomédica en sus

aspectos más mecanicistas, se realiza sobre modelos celulares. Posiblemente si se preguntara a cualquier investigador si utiliza los sistemas *in vitro* como alternativa a los animales de experimentación diría que no, que la utilización de sistemas celulares o de cultivo de tejidos resulta la metodología más adecuada para alcanzar sus objetivos. Por otro lado, los métodos *in vitro*, computacionales y ensayos bacterianos son la base de la industria química y farmacéutica en el desarrollo de nuevas moléculas o principios activos, y que tras la adecuada selección, se someterán a todas las pruebas de eficacia y seguridad requeridas para poder comercializarse. En estos casos la rapidez, versatilidad y bajo coste priman, permitiendo que la actividad industrial se mantenga en términos aceptables.

Más allá del concepto y definición de cada una de las R, subyace en la filosofía de las 3Rs la idea de que un trato humano en la experimentación animal es un prerrequisito para obtener el éxito científico, o como literalmente expresaron los autores: "Los más importantes experimentos científicos han sido siempre los más humanos y los más atractivos estéticamente, transmitiendo ese sentido de belleza y elegancia que es la esencia de la ciencia en su más alto concepto." (Russel and Burch 1959)

Durante los últimos 45 años, el concepto de las 3Rs se ha aplicado en leyes, políticas, y directrices de ámbito mundial y ha sido el punto focal de varios centros gubernamentales y universitarios. También ha sido el principio guía del trabajo de miles de científicos, personal de laboratorio y numerosas organizaciones de protección de animales. Este principio ha sido responsable, en parte, de las drásticas reducciones en el uso de animales de laboratorio que han ocurrido en el último cuarto de siglo y de los cambios significativos en las técnicas de investigación, de ensayo y educación en beneficio de la ciencia y la salud pública, así como de los animales.

Algunos de los avances más dramáticos en los últimos años se han dado en las áreas de corrosividad ocular y cutánea, fototoxicidad y producción de anticuerpos monoclonales. Otros avances menos conocidos, pero también muy importantes, han ocurrido en la valoración de productos biológicos, en metodologías de educación médica y veterinaria y en el manejo y mantenimiento de animales para fines experimentales. Quizás, uno de los más importantes logros, y desde luego un punto de inflexión en la historia de las 3Rs y los ensayos con animales, fue la supresión en Diciembre de 2002 de la prueba de estimación de la Dosis Letal 50 (DL50) de todas las normativas gubernamentales internacionales de ensayos sobre productos químicos.

No obstante y en muchos aspectos, gran parte del potencial práctico de la filosofía de las 3Rs todavía está por alcanzar. El concepto de las tres Rs no ha penetrado tanto en la universidad ni en la investigación biomédica aplicada, como lo ha hecho en la industria y toxicología (p. Ej. en los ensayos regulatorios). La ingeniería genética sobre ratones ha alterado la tendencia global descendente del uso de animales y aún más, la ha invertido. En las últimas estadísticas publicadas en Reino Unido en septiembre de 2004, y por segundo año consecutivo, se ha observado un incremento del 2,5% de los animales utilizados y el factor que más ha contribuido ha sido el aumento en el empleo de transgénicos en la investigación biomédica. Esta preferencia de utilización de ratones como modelos de investigación en enfermedades humanas, todavía despierta un amplio rechazo desde algunos sectores científicos, particularmente después de haberse descartado algunos de los modelos, tras mostrar enormes diferencias fisiológicas y farmacológicas con humanos.

Por otro lado, los gobiernos aún dedican pocos fondos de manera explícita para el desarrollo e implementación de las 3Rs. La atención que se le presta a la reducción está muy por detrás del que se le otorga al refinamiento y al reemplazo. La información acerca de los avances en refinamiento es lenta y se difunde con dificultad entre las diferentes instituciones y países. Los perfiles nacionales e internacionales sobre datos recientes de utilización de animales de laboratorio son todavía insuficientes para realizar una planificación racional de las prioridades de investigación y promoción de las tres Rs.

Finalmente, la validación de métodos alternativos, el proceso mediante el cual se establece la relevancia y la fiabilidad de un método para un determinado fin, es un proceso lento, caro y causante en gran medida de los cuellos de botella que retrasan la aplicación de manera extensiva de gran parte de las alternativas existentes. Los procedimientos de validación son de reciente desarrollo, poco más de 10 años. En la actualidad la comunidad legislativa requiere que cada método sea validado mediante un proceso bien definido (<http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>) y que sólo tras superar dicho proceso sea incorporado en la normativa legislativa. Hasta el momento ECVAM- el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos- dependiente del JRC- CE ha validado 13 métodos, de los cuales parte han sido incorporados en la legislación Europea. ICCVAM, su agencia homóloga en Estados Unidos, ha validado sólo 2 métodos. Para que la aplicación del ensayo validado trascienda las barreras de la Europa comunitaria, el ensayo

en cuestión debe ser aceptado por los miembros de la OCDE. Evidentemente a mayor número de rondas de discusión y de consulta entre los diferentes países miembros, mayor tiempo requerirá un ensayo para que sea aplicado a escala mundial. El proceso de validación, verdadero talón de Aquiles en la globalidad de aplicación de la estrategia de las 3Rs, está siendo revisado y modificado en la actualidad con objeto de dotarlo de mayor flexibilidad y agilidad. (<http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>).

Esta revisión en el proceso de validación, largo tiempo demandada, dará previsiblemente respuesta a dos acontecimientos que han relanzado el debate sobre experimentación animal a los primeros planos de la actualidad. Por un lado, la futura política de evaluación de productos químicos en Europa, REACH (Registration Evaluation Autorization of Chemicals), cuyas primeras estimaciones suponían la utilización de más de 12 millones de vertebrados en menos de 10 años. Y por otro lado, la demanda de evaluación de disruptores endocrinos en Estados Unidos y Europa de la que también se puede temer un notable incremento en el uso de animales. Está claro que las normativas existentes deben implementarse y actualizarse antes de abordar una estrategia global tan ambiciosa como la EU- REACH.

El potencial que ofrecen los métodos alternativos y la adopción de una estrategia escalonada para la valoración de productos químicos podría paliar en gran medida el uso de animales para este fin. Por ejemplo, muchas de las metodologías normalizadas de evaluación de productos químicos son innecesarias, y otras, necesitan ser actualizadas para hacer uso de métodos más modernos y de nuevos conocimientos, así como para aplicar los nuevos enfoques siguiendo las estrategias de reducción y refinamiento.

Según resume Combes en una reciente editorial (B. Combes, 2005) los métodos de evaluación de toxicológica podrían resultar mucho más eficaces simplemente del siguiente modo:

- a) Acometiendo sólo aquellos estudios que sean capaces de proveer de datos relevantes.
- b) Haciendo mayor uso de estudios preliminares.
- c) Aplicando algunos ensayos simultáneamente a los mismos animales sin que por ello se comprometa su bienestar.
- d) Utilizando solo un sexo cuando sea posible.
- e) Eliminando test redundantes.

Bien es cierto que la filosofía de las 3R ha penetrado de manera desigual en los diferentes países. Estados Unidos mantiene una actitud menos activa que Europa en cuanto a la promoción del principio de las 3Rs. Dentro de Europa, por regla general, los anglosajones son los que mayor conciencia y en los que con mayor arraigo está instaurada ésta filosofía tanto en el mundo científico como en los diferentes sectores sociales. Es posible que sean múltiples las razones que justifiquen este fenómeno, pero sin duda una de las más importantes es el grado de industrialización y bienestar social. Si contemplamos el panorama europeo, la mayor parte de los laboratorios de Investigación y Desarrollo de las grandes empresas químicas, farmacéuticas y cosméticas se encuentran ubicados en Reino Unido, Alemania y Francia, y ello implica que la mayor parte de experimentación animal en términos absolutos, también se realiza en estos países. No es de extrañar por tanto, que el movimiento social de protección del animal de laboratorio esté más agudizado en ellos. En España el panorama es bien diferente: La magnitud de los sectores implicados en el mundo de las alternativas a los animales de experimentación es cualitativa y cuantitativamente menor que en Reino Unido o Alemania, por poner un ejemplo. De manera tradicional los países latinos gozan de costumbres socioculturales bastante peculiares en cuanto a la implicación del mundo animal, uniendo a esto la ya comentada menor presencia de grandes industrias químicas y biomédicas de I+D, hace que el grado de concienciación en la filosofía de las 3Rs esté todavía en menor desarrollo. Hasta hace muy poco tiempo, incluso las estadísticas sobre el uso de animales en experimentación eran escasas, incompletas y poco fiables. No obstante, la reciente publicación del nuevo real decreto sobre protección de los animales para experimentación y otros fines científicos (R.R. 1201/2005) modificará sustancialmente la situación, estableciendo la obligatoriedad del registro y aprobación de todos los procedimientos que conlleven el uso de animales y demandará de manera explícita el cumplimiento y la promoción del principio de las 3Rs.

Aunque las posiciones extremistas, por un lado en la defensa a ultranza del animal de laboratorio, como en el lado opuesto la de aquellos para los que los animales no deben gozar de ninguna consideración, son las que de alguna forma establecen los márgenes extremos en cuanto a las necesidades y a las expectativas, sólo aquellos que se mueven en el consenso son capaces de hacer cambiar la situación y avanzar en el camino de implantación de las 3Rs.

Esa tendencia al consenso entre los sectores implicados en el mundo del animal de experimentación es la base sobre la que se están estableciendo

las posiciones nacionales y europeas en el mundo de las alternativas a los animales de laboratorio. La idea de aunar Industria, Academia, Administración y Sociedades de protección de animales, se ha plasmado en España en una plataforma -REMA (Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal, <http://www.remanet.es>)-que tiene como finalidad lograr un menor y más racional uso de los animales de experimentación, integrando y coordinando las iniciativas de la Industria, la Administración y la Sociedad con las del Mundo Científico respecto a la aplicación e implementación del principio de las 3Rs. De manera casi paralela se ha establecido en Europa una plataforma de plataformas nacionales- ECOPA (European Consensus platform for Alternatives, <http://ecopa.vub.ac.be>) - en la que REMA participa como miembro fundador y que ocupa actualmente la vicepresidencia.

En un mundo cada vez más globalizado, el incremento en el intercambio de información y el planteamiento de objetivos comunes que permitan alcanzar cada vez mas logros en alternativas debe ser el hilo conductor para aquellas sociedades comprometidas con la filosofía de las 3Rs. Sólo si se establece una estrategia globalizada en cuanto a la aplicación de dicha filosofía se podrán evitar situaciones tan paradójicas como los anunciados cambios de ubicación de las instalaciones experimentales de multinacionales farmacéuticas, cosméticas y químicas desde países occidentales, con una fuerte conciencia social en cuanto a la protección y bienestar animal, hacia países orientales con criterios mucho menos estrictos.

Enlaces de interés

- Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal (REMA). <http://www.remanet.es>
- European Consensus platform for Alternatives (ECOPA) <http://ecopa.vub.ac.be>
- Comité Científico Asesor del Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos. <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
- Russell & Burch "The Principles of the Humane Experimental Technique: http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm

NUEVO ESCENARIO LEGISLATIVO: REAL DECRETO SOBRE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN Y OTROS FINES CIENTÍFICOS

Pilar León. S. G. de Ordenación de Explotaciones. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

La Unión Europea publicó en 1986 la Directiva del Consejo 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 otros fines científicos. En la misma fecha se adoptó la Resolución 86/ C 331/02 en la que los Estados miembros se comprometen a no utilizar animales en experimentos salvo para determinados fines y desarrolla las condiciones de utilización de los mismos en la enseñanza y la formación.

Aunque España ya traspuso dicha Directiva por medio del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, recientemente se ha publicado una nueva trasposición, el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

Este nuevo texto es una respuesta a las inquietudes que tanto el desarrollo de la investigación, como la experiencia adquirida a lo largo de los últimos años, han generado en el ámbito de la utilización de animales para experimentación.

Los puntos más novedosos en esta nueva normativa se refieren a la obligación de crear Comités Éticos en determinados centros, que deberán entre otras cuestiones considerar los métodos alternativos a la utilización de animales para cada uno de los procedimientos que se realicen, y a la creación de la Comisión ética estatal de bienestar animal, que deberá asesorar a centros usuarios, entre otras cuestiones, sobre los métodos alternativos y la técnicas que eviten procedimientos repetitivos o reiterados. La Comisión Ética Estatal estará integrada, entre otros, por representantes de diferentes Departamentos con interés en los animales de experimentación, de organizaciones no gubernamentales de carácter nacional que tengan como uno de sus objetivos principales la defensa del bienestar animal y de las asociaciones profesionales especializadas en los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

La seguridad de que para cumplir los objetivos de protección del bienestar de los animales es necesaria una adecuada aptitud del personal que se relaciona con ellos, ha llevado a una mayor regulación de su educación y formación.

En el texto que se ha publicado, se distinguen cuatro categorías profesionales, según su implicación en el proyecto, denominadas A, B, C y D, con diferentes requerimientos en cuanto a su currículo. Se contempla la posibilidad de la homologación, durante un periodo de tiempo limitado, de esta formación en atención a la experiencia de los interesados en el desempeño de las funciones propias de la categoría que se pretende homologar.

Finalmente se ha pretendido clarificar cuestiones que en la anterior redacción podían ocasionalmente resultar confusas, proporcionando instrucciones más concisas en cuanto a determinados requerimientos documentales o a las condiciones de alojamiento y manejo de los animales.

SESIÓN 2: REDUCCIÓN Y REFINAMIENTO

CONCEPTOS GENERALES

M^a del Carmen Fernández Criado. Directora del Gabinete Veterinario.
Universidad Autónoma. Madrid

De la aplicación de los Principios de Tres ERRES referidas al uso de animales en investigación, reemplazo, reducción y refinamiento, son estas dos últimas las que inciden de una forma directa en la actividad de un Establecimiento y en los criterios que el personal investigador utiliza en el momento de diseñar un experimento con animales.

REDUCCIÓN. Disminución del número de animales que se necesitan para llevar a cabo un experimento

REFINAMIENTO: Cualquier procedimiento que disminuya la severidad del experimento reduciendo el dolor, estrés y angustia en el animal.

¿Cómo se contemplan estos conceptos en la Legislación?

Directiva europea CEE 609/86, en su preámbulo pretende garantizar la reducción al mínimo o eliminación del sufrimiento de los animales utilizados en investigación y docencia.

El R.D. 1201/2005 (BOE de 10 de Marzo), define de forma concisa su finalidad en el Artículo 1.2. "... no se les cause dolor, sufrimiento, angustia o lesión prolongada, evitar la duplicación de los procedimientos y reducir al mínimo el uso de animales aplicando métodos alternativos". En el Artículo 16, cuando trata de las "Condiciones generales de los procedimientos", se vuelve a priorizar el uso de métodos alternativos cuando establece la elección de estos e base a:

- El que use menor número de animales.
- El que cause menor dolor sufrimiento y angustia.
- El que requiera un modelo animales con menor grado de sensibilidad neurológica.

REDUCCIÓN

Factores determinantes para su aplicación y que influyen en los resultados:

A) Diseño del experimento:

- Métodos estadísticos que requieran menor número de animales y garantice la precisión estadística.
- Refinamiento en los métodos de trabajo que eviten la necesidad de duplicar el experimento y se garantice su reproducibilidad.

Elección de la muestra: Estandarización de la población de animales

- Mejora de la calidad genética (OMG's, líneas consanguíneas, congénicas, coisogénicas, mutantes...).
- Animales microbiológicamente definidos: gnotobióticos. Infecciones subclínicas aumentan la variabilidad en algunos resultados.
- Selección de la muestra: uniformidad en el peso, sexo, edad, criador/proveedor.

Factores ambientales

- Instalaciones y jaulas adecuadas.
- Climatización regulada: Temperatura, humedad, ruidos.
- Control del fotoperiodo.
- Nutrición: Calidad del proveedor, composición del pienso, calidad del agua.
- Estabulación: Tipo de jaulas, lechos, número de animales por jaula, este factor, entre otros, incide directamente en la cantidad de alimento que un roedor puede ingerir, como en el estrés que pueden sufrir por falta de espacio.
- Personal: cuidadores de animales cualificados

B) Reutilización de animales

Se prohíbe esta practica siempre que el bienestar de los animales se vea alterado.

C) Uso de un mismo animal por varios grupos de investigación

Esta es una de las prácticas que reduce de forma significativa el uso de animales. Es aconsejable aplicarlo con animales grandes además de roedores y otras especies.

Desde la dirección de los Animalarios se podría coordinar a estos grupos siempre que se comuniquen las necesidades para llevar a cabo sus procedimientos.

REFINAMIENTO

Su objetivo es mantener la homeostasis del animal, que esté en armonía consigo mismo y con el medio, reduciendo la severidad de los procedimientos.

La legislación española (R.D. 1201/2005) define clara y reiteradamente este concepto en su Artículo 16.

Aplicación del REFINAMIENTO:

Antes del experimento:

- Enriquecimiento ambiental.
- Habituaación a los equipos.
- Socialización y habituaación con la manipulación del personal.
- Minimizar las restricciones como ayunos y aislamientos.

Durante el experimento

- Uso de técnicas no invasivas y que minimicen la severidad : PET, Telemetría, RMN, Ecografía.
- Técnicas adecuadas de anestesia.
- Aplicación de analgesia.
- Asepsia durante el procedimiento.
- Personal bien adiestrado tanto en el manejo del animal como en las técnicas quirúrgicas o de otro tipo.

Posterior al experimento

- Reconocimiento de los signos de dolor por personal cualificado
- Valoración del dolor y analgesia.
- Aplicación de los criterios de punto final.

Formación del personal.

En la legislación está muy bien definido quien puede manipular los animales y la formación de debe tener, tanto el personal de Animalario como los técnicos e investigadores. Este es uno de los factores mas importantes para poder aplicar los "Principios de las Tres ERRES" y garantizar un uso racional de los animales de laboratorio.

USO DE TÉCNICAS NO INVASIVAS: ECOGRAFÍA, RESONANCIA, DOLOR Y PET.

Domingo Gargallo-Viola. GlaxoSmithKline, DDW Centre, Tres Cantos, Madrid.

El descubrimiento de nuevos medicamentos es un proceso complejo debido al número de propiedades biológicas a tener en cuenta y por lo tanto al número de ensayos a realizar con los nuevos productos. La evaluación y caracterización biológica de nuevas entidades químicas es un elemento fundamental, y a pesar del incremento en la utilización de métodos alternativos, la utilización de animales sigue siendo necesaria para el avance de las ciencias biomédicas en general y especialmente para el descubrimiento de nuevos fármacos.

Los modelos animales son imprescindibles para evaluar la eficacia terapéutica de los nuevos medicamentos en un sistema dinámico e integrado imposible de valorar en estudios *in vitro*. Así mismo, se requieren modelos animales para valorar los posibles efectos secundarios o toxicológicos de los nuevos compuestos. Sin embargo, y asumiendo que los modelos animales son de vital importancia en el descubrimiento de nuevos medicamentos, tenemos que considerar las limitaciones que estos modelos presentan, debido a las posibles y a veces marcadas diferencias (metabólicas, farmacológicas, toxicológicas) existentes entre los animales de experimentación y los seres humanos. Por lo tanto, tenemos que evaluar la información generada por estos modelos e interpretarla cuidadosamente antes de extraer conclusiones. Además de considerar las diferencias existentes entre distintas especies de mamíferos, es importante analizar de forma crítica el valor de algunos modelos animales, utilizados por razones cuestionables, tales como: sencillez, coste o simplemente tradición. Estos modelos en algunas ocasiones podrían utilizarse para descartar compuestos en etapas tempranas del proceso de descubrimiento de nuevos medicamentos, pero generalmente no garantizan que los resultados obtenidos con ellos sean extrapolables a los seres humanos. Modelos en muchas ocasiones letales, basados en el estudio de poblaciones de animales y donde el animal es considerado más un "reactivo biológico" que un "paciente". Modelos sencillos, baratos pero que no mimetizan la patología humana y que además consumen un número elevado de animales. La evolución hacia modelos experimentales reproducibles, no letales, basados en individuos y no en poblaciones y donde el animal sea contemplado y considerado como un "paciente", es una necesidad y una obligación por parte de los investigadores.

Los modelos animales siguen siendo imprescindibles en biomedicina, pero deben mejorarse, reduciendo drásticamente el número de animales utilizados e incorporando técnicas de evaluación utilizadas en diagnóstico humano, escapando de criterios como letalidad, que en muchas ocasiones aparte de ser de fácil ejecución no aportan información concluyente para definir el perfil terapéutico de las nuevas moléculas.

El uso de técnicas no invasivas, como la imagen: resonancia magnética nuclear (RMN), tomografía o termografía utilizadas en humanos, están jugando un papel muy importante en la experimentación animal, utilizándose cada vez con mayor frecuencia. Estas técnicas nos permiten determinar y caracterizar patologías en animales de forma parecida a como se hace en centros hospitalarios y de esta forma correlacionar resultados obtenidos en modelos experimentales y datos clínicos en humanos. Además la utilización de estas técnicas reduce de forma significativa el uso de animales. Por lo tanto estas técnicas consiguen ambos objetivos, generar información relevante sobre las propiedades terapéuticas de los nuevos compuestos y reducir de forma sustancial el número de animales en experimentación.

DISEÑO EXPERIMENTAL: ESTRATEGIAS Y HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS.

Frederic Villamayor. Unidad de Bioestadística. Área de Desarrollo Preclínico. CIDF Ferrer Grupo. Barcelona.

I. RESUMEN

El diseño experimental consiste en la planificación de los estudios científicos, con el propósito de asegurar que los datos que se obtengan sean fiables y útiles de cara a la consecución de los objetivos del experimento, y de acuerdo con las especificaciones del mismo (entre las que se incluye, en caso de la experimentación con animales, el trato ético a éstos). Los elementos del diseño experimental a tener en cuenta son: Tipo de experimento, definición de la unidad experimental, métodos de aleatorización, variables a analizar y su tipo de escala, utilización o no de medidas repetidas, métodos de reducción del sesgo, el análisis estadístico a aplicar (concretando modelo estadístico, hipótesis nula y alternativa, pruebas y otros métodos estadísticos, tamaño muestral necesario, errores estadísticos que se está dispuesto a asumir, ajuste de la multiplicidad de pruebas y tratamiento de valores atípicos) y, finalmente, la presentación de resultados. Un correcto diseño experimental puede llevar a la reducción del número de animales a utilizar en un experimento, si el cálculo del tamaño muestral necesario es un número menor del previsto inicialmente o que el que tradicionalmente se haya venido usando. Un correcto diseño experimental también lleva a un mayor refinamiento de la experimentación ya que, sean más o sean menos los animales que se utilicen, nos asegurará la suficiente evidencia para apoyar las conclusiones, tanto en el caso de un resultado positivo, como en el de un resultado negativo: La utilización de esos animales no va a ser en balde. Jugando con las palabras del título, la mejor estrategia para asegurar el óptimo uso de las herramientas estadísticas será profundizar en el conocimiento de éstas, y procurar, como no, la consulta con un especialista. El empleo de programas de gestión de estudios que automáticamente hacen el análisis estadístico implica convertir el experimento en un juego de azar.

II. Definición de diseño experimental:

No existe una única definición de lo que es el diseño experimental. Parece que cada cual intenta encontrar una que se adecue a su particular campo de interés. Como muestra, el resultado de una búsqueda en Google (usando las

palabras clave DEFINE: EXPERIMENTAL DESIGN) ofrece entre otras las siguientes:

- Un diseño de investigación en el cual el investigador tiene control sobre la selección de participantes en el estudio, y estos participantes son asignados aleatoriamente a los grupos tratado y control. (Juvenile Justice Evaluation Center, Washington, www.jrsa.org/jjec/resources/definitions.html)
- Una rama de la estadística que intenta perfilar la forma en que los experimentos deben ser llevados a cabo de forma que los datos recopilados tengan valor estadístico. (Biology Teaching Organisation, University of Edinburgh, helios.bto.ed.ac.uk/bto/glossary/ef.htm)
- La utilización de métodos matemáticos y estadísticos para seleccionar el mínimo número de experimentos o compuestos para una óptima cobertura del descriptor o del espacio variable. (Biopharmaceutical/Genomic Glossary, Cambridge Healthtech Institute, www.genomicglossaries.com/content/research_genomics.asp).
- El protocolo de un experimento. Involucra la asignación de tratamientos a las unidades experimentales. (Acronyms and Glossary of Rice Terms, International Rice Research Institute, www.knowledgebank.irri.org/glossary/Glossary/E.htm)
- El protocolo de un experimento, el cual especifica las condiciones del tratamiento (variables independientes), qué es lo que se medirá (variables dependientes) y los métodos de asignación de los sujetos a los grupos. (Statistics Glossary, The School of Psychology, University of St. Andrews, psy.st-andrews.ac.uk/resources/glossary.shtml)

En vista de la variedad, y tras un esfuerzo de síntesis puede llegarse a la siguiente definición *ad hoc*, relevante por lo que hace al tema de la experimentación animal:

El diseño experimental consiste en la planificación de los estudios científicos, con el propósito de asegurar que los datos que se obtengan sean fiables y útiles de cara a la consecución de los objetivos del experimento, y de acuerdo con las especificaciones del mismo.

Es relevante, porque entre las especificaciones o condiciones en que se quiere que se realice el experimento debe contarse el trato ético de los animales de experimentación y la aplicación del principio de las tres erres.

En lo que sigue vamos a detallar los elementos del diseño experimental, para acabar comentando su encaje en la filosofía de las 3 erres.

III. Elementos del diseño experimental.

Al efectuar un determinado diseño experimental deben tenerse en cuenta los siguientes elementos que lo integran.

III.1. Tipo de experimento.

Tipo de experimento se caracteriza, de forma sucinta, mediante el número de grupos experimentales y los factores que se van a estudiar, y por si los factores se aplicarán sucesivamente sobre los mismos sujetos experimentales o si estos se adjudicarán a grupos distintos en cada uno de los cuales ensayará la influencia de distintas combinaciones de factores. Es habitual utilizar las expresiones "tipo de experimento" y "tipo de diseño experimental" como sinónimos, aunque el diseño experimental propiamente dicho abarca muchas más cosas, como se verá.

El tipo de experimento determina las preguntas a las que se puede dar respuesta con él, y viceversa, según las respuestas que se quiera obtener deberemos utilizar un tipo de experimento y no otro.

Por ejemplo, en el ámbito de la toxicología experimental lo más frecuente es realizar un experimento en que haya un grupo control negativo y 3 grupos de dosificación creciente, en ambos sexos. Este diseño en particular tiene dos factores (sexo y dosis) y permite responder a estas tres preguntas:

1. ¿Existe una proporcionalidad dosis-respuesta?
2. ¿La respuesta es distinta en cada sexo?
3. ¿La relación dosis-respuesta es distinta en cada sexo (hay interacción entre dosis y sexo)?

Si se realizase el experimento en un solo sexo, las dos últimas preguntas no podrían ser contestadas, pero si interesase que lo fuesen, el factor sexo debe ser incluido en el estudio.

Cuando fuese posible, puede reducirse el número de sujetos experimentales probando los distintos tratamientos de forma sucesiva en cada uno de ellos. Sería el caso de los diseños cruzados. En este tipo de experimentos la interacción entre tratamientos sucesivos debe ser investigada.

III.2. Unidad experimental.

Es la unidad mínima a la que se aplica el tratamiento, y cuya respuesta al mismo será independiente puedan presentar el resto. Cada rata, ratón, conejo, etcétera, va a ser la unidad experimental. En estudios de toxicidad embriofetal, los fetos no constituyen unidades experimentales, pero sí las hembras que los portaban, porque los fetos pertenecientes a una misma

camada pueden presentar respuestas relacionadas al compartir un mismo ambiente. Si en una misma jaula se alojan diversos animales de un mismo grupo experimental, y se efectúa el control de consumo de comida, la unidad experimental no será cada animal individual, sino cada jaula o el grupo completo de animales que haya en ella. En estudios *in vitro*, cada pocillo de una placa de cultivo sería una unidad experimental.

III.3. Métodos de aleatorización

Una de las condiciones para poder aplicar métodos de contraste de hipótesis es que las unidades experimentales hayan sido asignadas de forma aleatoria a los diferentes grupos. De esta manera se reparten las posibles fuentes de sesgo iniciales, sin que ninguna pueda tener preponderancia en algún grupo experimental concreto, si no es por azar, y podremos asumir que las únicas fuentes de variabilidad que vamos a encontrar serán los factores experimentales que se van a controlar.

Por ejemplo: Los animales llegan del centro proveedor en varias cajas de transporte. Un procedimiento incorrecto sería asignar todos los animales de la primera caja a un grupo experimental, todos los de la siguiente a otro, y así sucesivamente. Podría ser que todos los animales de una misma caja procediesen de unas pocas camadas, o que hubiesen estado cerca de una fuente de calor, de frío, o de gases en el camión... No podemos asegurar que eso no haya ocurrido. Si estos animales se asignan en bloque a un mismo grupo experimental, y si en ese grupo se detectase un efecto, podríamos erróneamente atribuir al tratamiento algo que en realidad ha sido causado por un factor desconocido e incontrolado que ha afectado a esos animales.

La aleatorización puede efectuarse de varias maneras:

- *Simple*: Cada animal se asigna secuencialmente a un grupo experimental, sin controlar otros factores. En estudios con un gran número de animales es el método más corriente.
- *Estratificada*: Se controla algún factor, como el peso, para asegurar que no haya diferencias entre los grupos formados inicialmente. En estudios realizados con pocos animales (p. ej. en perro) es recomendable cuando los animales de que se dispone presenten un rango de pesos amplio (aunque sea recomendable evitar este hecho).

Un proceso formal de aleatorización no será en principio necesario en estudios *in vitro*, dado que es perfectamente asumible la aleatoriedad de la toma de alícuotas y su siembra en los pocillos de las placas.

III.4. Variables a analizar, y su tipo de escala.

Deben enumerarse todas las variables que se van a analizar, así como declarar su condición de variables continuas, categóricas ordinales, categóricas nominales, o dicotómicas. Esto debe cumplirse particularmente en estudios de toxicidad *in vivo*, en que las variables que se van a analizar van a ser muchas, dado su carácter exploratorio y que en general no se conoce en cuál o cuáles van a ser los efectos que se van a producir.

El peso corporal, el consumo de comida, los resultados de los análisis de hepatología, el recuento de células viables en un pocillo, son ejemplos de variables de tipo continuo, que pueden tomar cualquier valor (dentro de los fisiológicos y del rango de detección y precisión de los instrumentos).

Los hallazgos histopatológicos pueden tratarse como una variable dicotómica (presencia/ausencia). Pero también puede cuantificarse un grado o gravedad de la lesión, que sería una variable de tipo ordinal, que puede tomar unos pocos valores o categorías discretas y ordenadas (ausente, leve, moderado, grave).

La determinación del estado de cada punto de implantación en un estudio de toxicidad embriofetal (feto vivo, feto muerto, reabsorción tardía, o reabsorción temprana), es un ejemplo de variable nominal. En cambio, la frecuencia relativa de fetos vivos, muertos o reabsorciones en cada camada es una variable de tipo cuantitativo.

III.5. Medidas repetidas.

Debe definirse si habrá variables que se analizarán repetidamente a lo largo del estudio, y con qué frecuencia... Así, p. ej., los controles de peso pueden efectuarse semanalmente, o los análisis hematológicos al inicio, a mitad y al final del tratamiento, y además tras un periodo de recuperación.

También son medidas repetidas las realizadas simultáneamente en un mismo individuo tales como los pesos de los órganos pares (en este caso, el factor de repetición no es el tiempo, sino el lado corporal), o el examen oftalmoscópico de ambos ojos. En este último caso, además, el análisis puede haber sido efectuado al inicio y al final del tratamiento, con lo que habrá un segundo factor de medidas repetidas.

III.6. Métodos de reducción del sesgo.

Un primer e importantísimo método de reducción del sesgo, aplicable al inicio del estudio, es la aleatorización que ya hemos comentado. No obstante, durante la ejecución y la evaluación del estudio existen prácticas que pueden evitar la aparición de sesgo. El sesgo, en definitiva, no es más que la acumulación incontrolada de los efectos de factores que se

desconocen en alguno de los grupos experimentales, lo cual enmascara y falsea los resultados del estudio-

- Es importante, sobre todo en estudios largos, efectuar una rotación de las jaulas dentro de la sala donde estén ubicadas, o distribuir las de forma que cualquier factor ambiental en que pueda establecerse un gradiente sea repartido lo mejor posible entre todos los grupos experimentales y en el tiempo (iluminación, corrientes de aire, etc.).
- Si es posible, en procedimientos que impliquen una valoración o diagnóstico más o menos subjetivos por parte de una persona, ésta no debería conocer el grupo experimental a que pertenece la muestra que esté evaluando: Recuento leucocitario diferencial, examen del sedimento urinario, etc. Es lo que se conoce como evaluación a ciegas.
- Los procedimientos que se realicen a lo largo de diferentes días (análisis de sangre, necropsias,...) deben incluir animales de todos los grupos experimentales y de todos los sexos. Además, a lo largo de un mismo día no debe procederse primero con todos los individuos de un mismo grupo, luego otro, y así sucesivamente, sino que deben hacerse en un orden aleatorio de todos los individuos.

III.7. Análisis estadístico:

Modelo e hipótesis.

El modelo estadístico es la asunción que el investigador intenta confirmar mediante un diseño experimental y las pruebas estadísticas adecuadas. El tipo de modelo más habitual es el lineal, en que se asume que los valores individuales que toma una variable son cada uno igual a una media general más el efecto de cada los factores que se quieran considerar (nivel de dosis, sexo, su interacción...) más un término de error aleatorio. Los factores pueden ser de tipo categórico o de tipo continuo, y en este último caso se denominan covariables. Los factores de tipo categórico pueden ser de tipo fijo (los niveles que toma el factor están completamente controlados por el experimentador) o de tipo aleatorio (los niveles de los factores son sólo una muestra escogida entre todos los posibles valores).

A lo largo de los años los programas dedicados a análisis estadística están incrementando la cantidad de modelos que son capaces de analizar, desde un simple diseño de 1 factor, hasta un diseño mixto con factores fijos, factores aleatorios y medidas repetidas y un ajuste específico de la matriz de covarianzas de las observaciones intraindividuales. Es muy recomendable aplicar estos modelos a nuestros diseños, pues son mucho más potentes que los tradicionales (que dicho sea de paso son tradicionales porque hasta ahora no ha habido manera de disponer de otros medios, cuando los ordenadores personales han llegado a ser lo suficientemente potentes).

Establecido el modelo, se pasará a efectuar el contraste de hipótesis, en que una hipótesis nula (habitualmente, la ausencia de efecto de un determinado factor) se confrontará a una hipótesis alternativa (que puede tomar diversas formas). Este contraste se somete a las pruebas estadísticas y, como resultado de ello, la hipótesis alternativa será rechazada o aceptada. Es importante entender que nunca una prueba estadística servirá para demostrar la hipótesis nula.

Pruebas y otros métodos estadísticos.

Existen multitud de pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis que hemos mencionado. La elección de una u otra no es una tarea trivial y debe hacerse antes de iniciar el protocolo. Es función, sobre todo, del tipo de distribución que se espera que sigan los datos que se van a registrar, y del modelo estadístico que se adopte. Aunque influyen también los medios de que se disponga.

Lo clásico es discriminar entre métodos paramétricos y métodos no-paramétricos. Los primeros son más potentes, si se cumplen las condiciones para su aplicación.

Tamaño muestral.

El tamaño muestral que se vaya a utilizar es un parámetro que está en conjunción con otros tres: La diferencia mínima que se quiera detectar (tamaño de efecto), el balance entre los errores de tipo I y de tipo II que se esté dispuesto a tolerar, y la variabilidad que puede esperarse que manifiesten las variables a analizar. Además, variará según el tipo de prueba estadística. Debe disponerse de toda esta información para poder efectuar el cálculo.

El tamaño muestral necesario crece al disminuir el tamaño del efecto, o al aumentar la variabilidad de la variable estudiada, la especificidad o la potencia de la prueba estadística. Y disminuye en caso contrario, cuando el tamaño de efecto es grande, o la variabilidad, la especificidad o la potencia requeridas son pequeñas.

Errores estadísticos.

El error de tipo I es la probabilidad de dar un efecto como significativo cuando en realidad no lo es (falso positivo). Habitualmente, se fija en $\alpha = .05$. Es decir, que se está dispuesto a asumir un 5% de resultados falsos positivos. Alternativamente, la probabilidad de acertar en el diagnóstico cuando no hay efectos reales es $1-\alpha = .95$ (la especificidad de la prueba estadística).

El error de tipo II es la probabilidad de no dar un efecto como significativo cuando en realidad sí lo es (falso negativo). Habitualmente se toma $\beta = .20$. Es decir, que se está dispuesto a asumir un 20% de resultados falsos negativos. Alternativamente, la probabilidad de acertar en el diagnóstico cuando hay efectos reales es $1-\beta = .80$ (la potencia de la prueba estadística).

Ajuste de la multiplicidad de comparaciones.

Cuando se planea comparar cada uno de los grupos tratados con el grupo control se está aumentando el riesgo de que alguna de las comparaciones sea estadísticamente significativa sólo por azar (error de tipo I). Si comparamos cada uno de tres grupos tratados con el control estamos efectuando 3 pruebas estadísticas simultáneas, cada una con una especificidad igual a:

$$E = 1 - \alpha = 1 - 0,05 = 0,95$$

La especificidad de la prueba múltiple es el producto de las especificidades de cada prueba:

$$E_m = E \times E \times E = (1 - \alpha) \times (1 - \alpha) \times (1 - \alpha) = (1 - \alpha)^3 = 0,857375$$

El error de tipo I de la prueba múltiple será por tanto:

$$\alpha_m = 1 - E_m = 1 - (1 - \alpha)^3 = 0,142625 > \alpha = 0,05$$

El error de tipo I que habíamos fijado y que estábamos dispuestos a asumir se ve sobrepasado.

De ahí la necesidad de contar con la utilización de pruebas estadísticas que ajusten su resultado al hecho de que se están efectuando comparaciones múltiples.

Tratamiento de valores atípicos.

Los valores extremos pueden alterar la distribución de la muestra de forma que el método de análisis que habíamos previsto sea inaplicable, ya que aumentan la variabilidad y disminuyen la potencia de las pruebas estadísticas. Existen diversas alternativas para manejarlos, entre las que se incluyen su transformación matemática para obtener una nueva distribución que se ajuste mejor a la normal; la utilización de estadísticos

descriptivos robustos; la utilización de métodos estadísticos que sean independientes de la distribución de los datos; o, incluso, su eliminación del análisis, aunque únicamente si se encuentra una razón que los invalide para el mismo.

Debe tenerse claro antes de empezar el estudio qué es lo que se va a hacer con los valores atípicos.

III.8. Presentación de resultados.

Los datos deben resumirse utilizando los estadísticos descriptivos adecuados al tipo de variable y a su distribución. Debe como mínimo incluirse información sobre la tendencia central de la distribución (media, mediana, moda...) y su variabilidad (varianza, desviación típica, cuartiles, rango intercuartil...).

Los datos binarios, o categóricos se representarán mediante tablas de contingencia con sus frecuencias absolutas y relativas en cada grupo experimental.

La supervivencia a lo largo del tiempo se representará mediante tablas de supervivencia y su representación gráfica de Kaplan-Meier.

Al comparar los pesos u otras variables registradas a lo largo del tiempo debe tenerse en cuenta la mortalidad, y no incluir en los cálculos aquellos animales muertos a lo largo del estudio o con un registro incompleto de la serie.

A pesar de que una buena tabla de resumen de resultados da mucha información sobre el estudio, es muy importante el examen de los valores individuales, no sólo de los valores medios. Sería irresponsable relacionar dos efectos únicamente porque las medias en el grupo tratado se vean alteradas simultáneamente. Sólo podremos imputar dicha relación si la alteración coincide en los mismos animales.

La estadística inferencial (contraste de hipótesis) sólo debería efectuarse en aquellos casos en que se sospeche que existe un efecto plausible del tratamiento. En toda prueba que se realice existe una probabilidad de error. En el caso del error de tipo I es del 5 %, lo cual quiere decir que de cada 20 pruebas estadísticas que realicemos en un estudio en 1 de ellas el resultado podría ser estadísticamente significativo sin otra causa real que el azar. Reduciendo el número de pruebas, pues, se podrá analizar de forma más eficiente la información, focalizando el análisis sólo en aquello que sea relevante. De nada sirve reportar en un estudio una bajada estadísticamente significativa de los niveles de AST, cuando sabemos que lo que es indicativo de toxicidad es únicamente un aumento de dichos niveles.

IV. Las 3 erres y el diseño experimental.

La ejecución de un buen diseño experimental puede influir en dos de las 3 erres.

El cálculo del tamaño muestral necesario para cumplir con los objetivos del estudio puede significar una reducción del número de animales que habitualmente se vienen utilizando. Ello podría ser cierto en estudios en que se evalúe una variable principal, y como máximo unas muy pocas variables secundarias. Pero, atención, que puede que nos encontremos con que el número calculado sea aún mayor. Por otro lado, los estudios exploratorios de toxicidad general evalúan una enorme cantidad de variables, y el tamaño muestral adecuado para analizar algunas de ellas puede ser insuficiente para analizar otras. Y no debe olvidarse el tema del costo del estudio. En definitiva, el criterio estadístico al final no va a ser el único determinante que intervenga en la elección del tamaño muestral. Podría parecer que la contribución a las 3 erres, por lo que respecta a la reducción, no sería tanta. Pero esta podría decirse que casi inesperada laguna se ve compensada por la contribución de un correcto diseño experimental al refinamiento del estudio: La garantía de que, sean más o sean menos los animales que se utilizarán, nos asegurará la suficiente evidencia para apoyar las conclusiones, tanto en el caso de un resultado positivo, como en el de un resultado negativo: La utilización de esos animales no va a ser en balde. Un experimento cuyo resultado negativo se origina en un número insuficiente de animales es tan poco ético como otro experimento con un resultado positivo pero con un exceso de animales sobre los que hubiesen sido necesarios para un mismo resultado.

V. Diseño experimental: Estrategias y herramientas estadísticas.

Y para acabar, y jugando con el título de esta charla, la principal estrategia para lograr un óptimo diseño experimental será la utilización de la mejor herramienta estadística que existe, y que no es otra un conocimiento adecuado de la estadística, procurándose si es necesario el concurso de un especialista en trabajo conjunto con la persona que, con un conocimiento adecuado de los posibles mecanismos biológicos subyacentes en los procesos que se estén estudiando, deberá llegar a una interpretación plausible de la evidencia estadística.

Desde mi trabajo he podido examinar cómo los estudios de toxicidad de nuevos fármacos se sirven de una estadística basada en lo que proporcionan los programas de gestión informatizada de los estudios. Éstos realmente se limitan a aplicar sobre todas y cada una de las variables unas pruebas de contraste de hipótesis que no es que no sean las adecuadas, sino que lo que ocurre es que se aplican de forma exhaustiva, poniendo automáticamente

etiquetas de "significativo" o "no-significativo". Y luego esa etiqueta se toma como la prueba definitiva de que hay un efecto real, sea el que sea, incluso aunque no pueda encontrarse en absoluto una explicación biológica de ese efecto; incluso aunque ese efecto sea del signo contrario al que indicaría la presencia de toxicidad; incluso olvidándose de que en tal y como se diseñan habitualmente los estudios, existe un riesgo de un 5% de que un efecto "significativo" no sea real. O lo que es peor: La ausencia de la etiqueta se toma como prueba de que no hay efecto, cuando la interpretación correcta es que no hay evidencia de que haya efecto.

Ganar apostando un número a la ruleta tiene una probabilidad igual a $1/36 = 0.0278$, que es casi la mitad de la probabilidad de obtener un falso positivo. Es más fácil obtener un falso positivo que ganar a la ruleta. Un buen diseño experimental y una correcta utilización de las herramientas estadísticas van a influir en el trato ético del animal de experimentación, como hemos visto, pero también en una mejor y más segura aplicación posterior del objeto de los estudios en nuestra propia especie, una aplicación que no se merece que la convirtamos en un juego de azar.

VI. Material adicional

- Channon, EJ y. Ashley AH. Power Calculations for General Toxicology Studies. *Drug Information Journal*. 1997, **31**:449-457.
- Departamento de Estadística de la Universidad Nacional de Colombia. Programa Universidad Virtual - Diseño experimental. (última visita: 6-11-2005) <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000352/index.html>
- Healey GF. How to achieve standarization of statistical methods in toxicology. *Drug Information Journal*. 1997, **31**:395-401.
- Hothorn LA *et al.* Recommendations for biostatistics of repeated dose studies. *Drug Information Journal*, 1997, **31**:327-334.
- Mullee MA. Web-based resources to assist the statistical analysis and presentation of data. *Pharmaceutical Statistics*. 2005; **4**: 129-139
- Russ Lenth's power and sample-size page. (última visita: 6-11-2005) <http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>

SESIÓN 3: UTILIZACIÓN PRÁCTICA DE RECURSOS INFORMÁTICOS EN LAS APLICACIONES DE LAS 3RS.

CONSULTA BIBLIOGRAFICA Y USO DE BASE DE DATOS. Guillermo Repetto^{1,2}, Eduardo de la Peña³, Jorge L Zurita¹, Angeles Jos², Ana del Peso¹, Ana M. Cameán²¹ Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla. Avda Dr Fedriani s/n; 41009 Sevilla. repetto@us.es² Area de Toxicología. Universidad de Sevilla³ Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. epena@ccma.csic.es

<http://www.us.es/toxicologia/alternativas.htm>

ORGANIZACIÓN DEL TALLER PRÁCTICO. CURSO REMA 2005

1. Presentación de las principales bases de datos con información sobre alternativas y recomendaciones para las búsquedas
2. Realización práctica de ejercicios de búsqueda para conseguir la familiarización con las bases de datos
3. Puesta en común sobre las búsquedas realizadas
4. Propuestas personalizadas de localización de información
5. Puesta en común de los resultados de las estrategias empleadas y extracción de conclusiones

LA NECESIDAD DE UTILIZAR ALTERNATIVAS A LA EXPERIMENTACION ANIMAL

Los investigadores no sólo por razones éticas, logísticas, económicas y científicas, sino también por requerimientos legales están obligados a demostrar la necesidad de realizar estudios experimentales utilizando animales. La finalidad de las normativas es asegurar la protección animal 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 (Dir 86/609/CE; RD 1201/2005). Como métodos alternativos se incluyen a aquellas técnicas o estrategias experimentales que cumplen con el «principio de las tres erres» (reducción, refinamiento y reemplazo)

En la practica las opciones de alternativas disponibles son las incluidas en la tabla siguiente.

CLASIFICACIÓN DE LOS METODOS ALTERNATIVOS.

1. Evitar la repetición innecesaria de experimentos:

Protocolos y estudios previos: Disponibilidad de la información, intercambio. Flexibilidad.
Estrategias integradas

2. Modelos Matemáticos de Predicción:

Cinética ambiental
Fármaco-toxicocinética (PB-PK)
Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR)

3. Mejoras en el diseño de los estudios animales:

Reducción: número de animales usados
Refinamiento: minimización del dolor y angustia; nuevos modelos

4. Uso de organismos inferiores no protegidos:

Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, animales invertebrados

5. Embriones de Vertebrados:

Peces, anfibios, reptiles, pájaros, mamíferos

6. Métodos *In vitro* :

Organos: baños, perfusión, cultivo, cortes, órganos reconstituidos
Explantos, reagregados celulares, micromasas, cocultivos
Cultivos primarios de células dispersadas
Lineas celulares / transgénicas
Sistemas libres de células

7. Otros:

Estudios en humanos: voluntarios, epidemiológicos, vigilancia
Modelos en la enseñanza y formación: Modelos mecánicos, sistemas audiovisuales, y simulaciones por ordenador y de realidad virtual

(Repetto, 1999)

Ello implica que el investigador es responsable de la realización de búsquedas bibliográficas que demuestren que la información no está ya disponible, que no existe otro procedimiento para llevarlo a cabo sin emplear animales y que el protocolo se ha diseñado teniendo en cuenta todos los aspectos de protección animal.

Para facilitar todo ello se ha desarrollado en Buscatox un módulo sobre alternativas a la experimentación animal.

LA LOCALIZACIÓN DE LA INFORMACION

Lamentablemente la indexación actual de las publicaciones en las bases de datos no facilita la búsqueda de alternativas. Por diversas razones, los términos como "Animal use alternatives, reduction, refinement..." varían según la base de datos y sólo se están aplicando en una pequeña proporción de los estudios a los que les correspondería, por lo que son poco útiles para recuperar la información y obliga a utilizar en las búsquedas términos mucho más concretos.

- La información contenida en las bases de datos está limitada por muchas razones como son los sesgos de publicación, idioma, de cobertura, del patrocinador o de disponibilidad de acceso
- Además, es imprescindible buscar la misma información en varias bases de datos, ya que la información está muy repartida
- La persona que realiza la búsqueda también aporta sus propios sesgos, entre los que se encuentran el sesgo de soberbia, el cultural o de tradición, el sesgo de la experiencia personal; el sesgo de la amistad; el sesgo de la fama de la institución/autor/revista; o el sesgo geográfico, que favorece a países importantes y a nuestros vecinos.
- Para mejorar la efectividad, es necesario familiarizarse con la base de datos, ya que cada una está estructurada de forma diferente.
- Son muy útiles los sistemas de búsqueda simultánea en varias bases de datos.
- Para que las búsquedas sean productivas es necesario que se realicen sistemáticamente. Ello implica que se ejecuten siguiendo un método explícito y reproducible, que reduzca al mínimo los sesgos y que seleccione la información más relevante.
- Es preciso definir claramente qué información se desea encontrar.
- Es recomendable preparar previamente una lista con los descriptores, sinónimos o frases que mejor definan el objetivo del estudio o área de estudio. Puede usarse como base un protocolo o publicación similar a la prevista.
- No existe una terminología universalmente aceptada sobre alternativas, por lo que la indexación de los documentos no facilita su búsqueda.
- Por ello, la elección de los términos adecuados requiere práctica y la realización de pruebas. Es muy útil comenzar con palabras clave de algún

documento de tema semejante al objetivo, o conocer los que emplee la base de datos.

- Es preciso emplear el idioma de la base de datos. En el caso del inglés, puede ser conveniente emplear determinadas palabras en sus modismos británico y americano (anaesthesia, anesthesia)
- Las diferentes estrategias de ir añadiendo o reduciendo términos persiguen obtener un número adecuado, es decir, suficiente pero no demasiado alto que permita manejar las respuestas.
- Para ello, los términos suelen combinarse entre sí para reducir el número de respuestas, en ventanas adecuadas o con comandos de:
 - Inclusión de ambos: y / and / +
 - Inclusión de alguno: o / or
 - Exclusión: no / not / -
 - Frase exacta: "...."

Dado que la información se encuentra dispersa en diversas bases y / o páginas web deben seleccionarse varias de acuerdo con los siguientes criterios:

- Veracidad, es decir, fidelidad a los documentos originales
- Objetividad en el tratamiento de los datos, separando la información de cualquier tipo de anuncios, y si es posible, citando la fuente original
- Relevancia, o interés real de la información que contengan
- Cobertura temática amplia y cantidad de información
- Actualización periódica
- Facilidad de manejo
- Autoría y responsables bien definidos: personal o corporativa
- Finalidad: educacional, promocional, comercial, etc.
- Audiencia potencial
- Alcance geográfico amplio

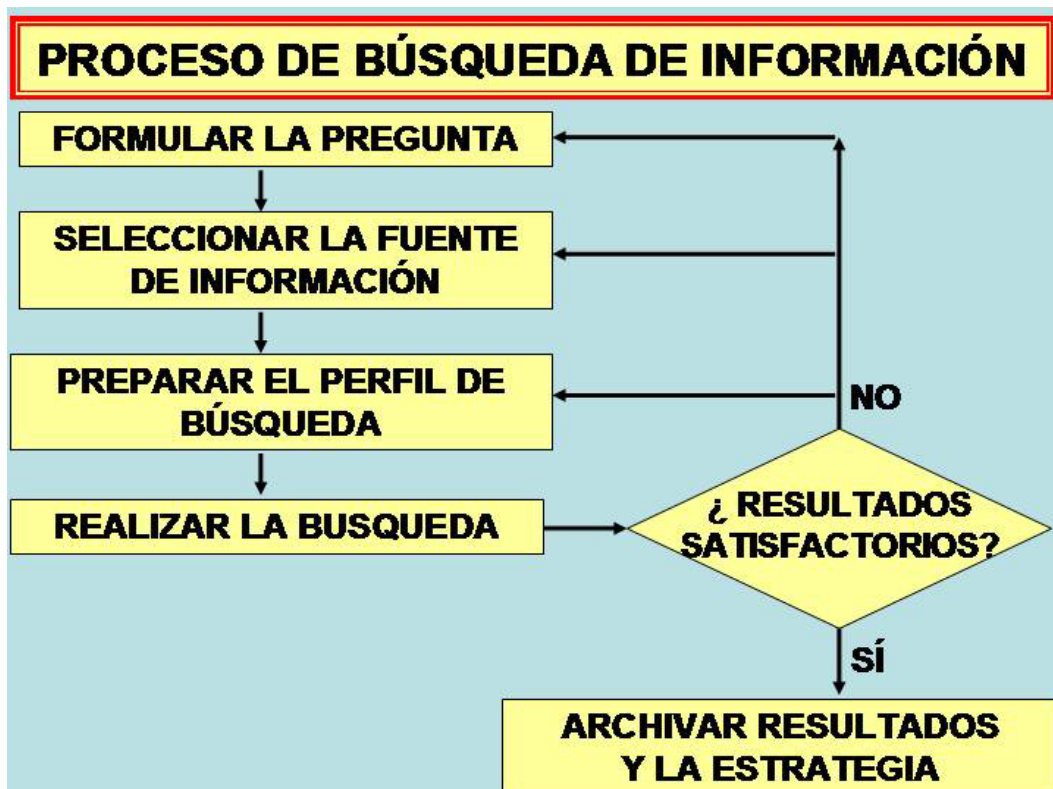
- Deben utilizarse tres tipos de bases de datos:
 - Bibliográficas (PubMed, Agrícola, Altbib)
 - Factuales o de datos depurados (AnimAlt-Zebet, dbAlm)
 - De información diversa y páginas web especializadas: (AltWeb)

El proceso de búsqueda de información se realiza en las siguientes etapas:

1. Formulación de la pregunta en forma clara, precisa y concisa.
2. Preparación del perfil de búsqueda, es decir, de la forma de

plantear la pregunta combinando varios términos. Esta fase es la más importante

3. Selección de la base de datos
4. Realización de la búsqueda
5. Evaluación inicial de los resultados en forma cuidadosa. Para ello comprobamos el número de registros encontrados. Un número entre 10 y 60 puede ser útil en la mayoría de los casos, aunque podrán ampliarse o restringirse los resultados según el tipo de estudio.
6. Modificación del perfil de búsqueda para ampliar o restringir el número de resultados. Una posible estrategia, a menos de que se esté realizando una revisión exhaustiva, es tratar de obtener menos de 300 registros. A partir de la lectura de los títulos se realiza una segunda selección de unos 50 de ellos de los cuales se leerán sus resúmenes, y una tercera de unos 15 trabajos que se estudiarán completos.
7. Archivo de los resultados satisfactorios y la estrategia de búsqueda.
8. Repetición de la búsqueda en al menos dos bases de datos



Por lo tanto, debe realizarse una planificación previa, y seguir una secuencia de pasos protocolizados, que incluyen el registro de la metodología empleada que permita a cualquier persona, repetir la búsqueda y acceder a las mismas referencias o artículos.

Los portales o buscadores generales o de amplio espectro pueden ser útiles para encontrar algunos documentos específicos, pero no son útiles para búsquedas generales (ej. Alternativas). Aunque no garantizan el éxito de la búsqueda ni la objetividad de la información, resultan interesantes por gran capacidad de rastreo de archivos y páginas por gran parte de la red. Sin embargo están muy limitados ya que no revisan bases de datos específicas, ya que que no tienen acceso a su información. Por lo tanto encontrarán documentos concretos, pero no información depurada.

ESTRATEGIAS DE BUSQUEDA DE ALTERNATIVAS

Deben emplearse siempre varias bases de datos. La selección de enlaces recomendados se ha realizado atendiendo a criterios personales, y sobre todo escogiendo sólo las direcciones más valiosas. Por lo tanto no se ha perseguido una revisión exhaustiva, sino útil.

Deben revisarse al menos los documentos de los últimos 5-10 años.

Deben anotarse las bases de datos utilizadas, el intervalo de tiempo que cubren, los descriptores de la búsqueda, la fecha y el resultado obtenido.

Para la búsqueda de Alternativas en la enseñanza y entrenamiento debe pasarse directamente a su apartado correspondiente.

Para investigaciones toxicológicas, de seguridad química o de estudios con finalidad reguladora, se accede en primer lugar al apartado de Toxicología

Se sugiere una estrategia de búsqueda de alternativas, aunque existen otras muchas posibles.

1 Alternativas y Reemplazo

1.1.- Asegúrate de que la información que pudieras obtener en tu estudio no ha sido ya conseguida

Para ello consulta varias bases de datos bibliográficas generales (PubMed, Agrícola, etc) y bases de datos específicas de tu especialidad. (Además de Pubmed debieran usarse, siempre que sea posible, Embase, Biosis y Science Citation Index)

Si encuentras estudios que utilicen metodologías similares a las que pretendes emplear, anota las palabras clave que los describen.

1.2.- Búsqueda de alternativas a la experimentación animal:

En las bases de datos generales incluye términos que definan el objetivo básico del estudio, no la metodología que pretendes usar Ej: efectos E. coli hígado

Una vez que obtengas resultados, restringe la búsqueda a posibles modelos alternativos. Lamentablemente los descriptores como "alternatives" no son demasiado útiles, pero conviene probarlos. Otras opciones son:

alternative
animal testing alternatives
animal use alternatives
Reduce
Refine
Replace
Vitro

Intenta sobre todo localizar posibilidades de sustitución o reemplazo añadiendo (AND) algun/os términos relacionados con la sustitución, usando entre ellos OR. Ej: coli AND liver AND (vitro OR cell line OR hepatocyte)

REPLACEMENT <i>Computers etc.</i> artificial intelligence computer aided/assisted instruction/learning education image imaging interactive model (modelling)	<i>In vitro systems:</i> assay cadaver cell cell line cellular culture cytosolic fraction dermal equivalent embryo explant
--	--

<p>prediction simulation teaching training expert system mathematical model (modelling) QSAR, SAR, structure-activity relationship software theoretical model (modelling) virtual</p> <p><i>Physicochemical systems</i> artificial, chemical, physical, physicochemical, assay, membrane, method, model, system, technique</p> <p><i>Non-mammalian organisms</i> algae, bacteria, fish, fungus, hydra, insect, invertebrate, microorganism, plant, protozoan, yeast</p>	<p>ex-vivo fragment human isolated method microsomal model organ organelle reconstituted slice subcellular fraction technique tissue tissue equivalent vitro (no incluir In)</p>
---	--

Si no encuentras ninguna alternativa válida de sustitución, revisa cuales son los modelos animales ya utilizados por otros investigadores con similar finalidad y pasa al punto siguiente

2 Búsqueda de alternativas de reducción y refinamiento

Si no hay otra opción que el empleo de animales, debes actualizar el protocolo experimental teniendo en cuenta los últimos avances científico-técnicos en diseño experimental, para reducir el número de animales en lo posible y evitar estrés y dolor.

<p>REFINEMENT</p> <p>animal combinado con: Acclimation & Quarantine</p> <p>Blood collection cage caging housing husbandry Iniection</p>	<p>Monitor distress (non-)invasive pain postoperative postsurgery stress</p> <p>anaesthesia anaesthetic</p>
--	---

welfare	analgesia
enrichment	analgesic
behavioural	anxiolytic
environmental	hypnotic
	sedative
euthanasia	
handling	
restraint	

REDUCTION	
reduce	statistical + analysis
reduction	model
experimental design	

La búsqueda en bases de datos generales de algunas publicaciones recientes con un protocolo similar puede ser muy útil. La ayuda de un experto en protección y experimentación animal es muy recomendable.

Sin embargo ello debiera complementarse con la revisión de cada una de las etapas del procedimiento teniendo en cuenta los objetivos precisos del mismo, sobre todo revisando bases de datos específicas de reducción y refinamiento que ayuden en:

- Selección de la especie animal
- Modelos de enfermedades
- Diseño experimental: Estimación del número mínimo de animales en cada grupo experimental y del número adecuado de grupos experimentales que asegure la validez estadística
- Métodos de administración y de toma de muestras
- Observación y programas de ordenador
- Indicadores de conducta, efecto e indicadores humanitarios
- Dolor y métodos de analgesia y anestesia
- Método de sacrificio
- Tratamiento de los datos y estudio estadístico
- Condiciones generales (alojamiento, manejo, etc)

3 Alternativas en estudios toxicológicos o de finalidad reguladora

Si se trata de un estudio regulado, será obligatorio el seguimiento de un procedimiento estandarizado aceptado por las autoridades. Pero incluso aunque se trate de una investigación básica, es muy conveniente comprobar si existe alguna directriz que sea útil o adaptable para el objetivo propuesto.

Si no está disponible un protocolo específico, debemos comenzar desde el principio revisando las bases de datos generales.

4 Alternativas en la enseñanza y entrenamiento

Existen muy completas bases de datos específicas que recogen numerosas posibilidades en la enseñanza y entrenamiento de diferentes disciplinas sin precisar del empleo de animales. Además podemos investigar en bases de datos bibliográficas. También existen sistemas dirigidos a mejorar la preparación de las personas que manejan animales de experimentación.

education, training, teach*, instruct* mannequin or manikin simulat* video	virtual (surgery, reality) cadaver software, computer
---	---

5 Otras

Muy diversas instituciones proporcionan información sobre alternativas

6 Foros Científicos de Discusión sobre alternativas y empleo de animales

Si no encontramos nada útil, podemos solicitar la ayuda de un experto, bien directamente o en foros de debate. Los profesionales afines interactúan entre sí y debaten en diversos foros de Internet, como son

3Erres- Foro de Alternativas a la Experimentación animal
<http://www.rediris.es/list/info/3erres.es.html>

SECAL-L: Foro de la Sociedad Española para las Ciencias del animal de Laboratorio <http://www.secal.es/>

Toxicol- Foro de Toxicología <http://www.rediris.es/list/info/toxicol.html>

Farmacol- Foro de Farmacología
<http://www.rediris.es/list/info/farmacol.es.html>

COMPAMED Comparative Medicine Discussion List: mensaje a listserv@listserv.aalas.org y en el cuerpo: subscribe COMPAMED Nombre Apellido

IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) Forum
<http://www.iacuc.org>

¡Pero por favor, primero debes realizar las búsquedas!!!!!!!!!!

National Agricultural Library **AGRICOLA**

Article Citation Database

- Base de datos bibliográfica AGRICultural OnLine Access, Biblioteca Nacional de Agricultura Norteamericana (NAL), incluye desde 1970 citas de literatura sobre agricultura, veterinaria, entomología, plantas, acuicultura, pesca, ganadería, alimentos, nutrición y ciencias medioambientales.
- Mucho más amplia que Medline y otras bases de datos en las ciencias del animal de laboratorio.
- Prestar atención a los operadores
- Términos indexados: Animal Testing Alternatives, Animal Use Alternatives, Animal Use Reduction, Animal Use Refinement y Animal Use Replacement.
<http://agricola.nal.usda.gov/>

PubMed

National
Library
of Medicine 

- Servicio gratuito de la Biblioteca Nacional de Medicina Norteamericana que incluye más de 15 millones de citas de artículos biomédicos (Medicina, Enfermería, Odontología, Veterinaria y otras ciencias preclínicas) publicados desde 1950, y extraídas de MEDLINE (4800 revistas biomédicas), OLDMEDLINE (2 millones de citas de artículos sin resúmenes) y de otras diversas revistas científicas. Enlaza con páginas que venden los textos completos.
- Términos indexados: Animal Testing Alternatives y Animal Use Alternatives
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

DIMDI Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information
Im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit und Soziale Sicherung

Das DIMDI **Arzneimittel** **Arzt+Patienten**

BfR
Risiken erkennen – Gesundheit schützen

basic search »
advanced search »
expert search »
database selection »
registration »

» show paid documents »

search

Hint: For more databases or own selection please use ? symbol for truncation e.g. heart?

search for:

» display filters

active databases:
ZT00 AnimAlt-ZEBET

- **AnimAlt-ZEBET**
- Base de datos de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal en Biomedicina y campos relacionados del Instituto Alemán de Documentación e Información Médica
- Unos 120 documentos con revisiones muy bien documentadas
- Permite además la búsqueda simultánea en varias bases de datos como XMEDALL, XPHARMALL, XTOXLITALL, XVET
- <http://www.bfr.bund.de/cd/1508>

- **Altweb**- Alternativas al Ensayo Animal, en la Web, del Johns Hopkins Center For Alternatives To Animal Testing. Pretende ser un repositorio de documentos.
- Sus apartados más interesantes son las noticias y dos bases de datos específicas
- **Búsqueda de Alternativas**
<http://altweb.jhsph.edu/searchalt.htm>
- **La Base de Datos de Manejo del dolor (Pain Management)** informa sobre los métodos de anestesia y analgesia en animales de experimentación y sus efectos adversos
http://www.altwebsearch.org/aadb/aadb_search.cfm
- **La Base de Datos sobre Indicadores Humanitarios (Humane Endpoints/Eutanasia)** ayuda a decidir cuando debe finalizarse un experimento o aplicar tratamiento para evitar dolor o malestar
<http://apps1.jhsph.edu/altweb/humane/search.cfm>

Toxicología: UE



- **dbALM- Base de datos del ECVAM Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos. Incluye documentos resumidos con información sobre los procedimientos en proceso de validación y aceptación, así como sobre modelos QSAR.**
- **Incluye además la base de protocolos INVITTOX.**
- **<http://ecvam.jrc.it/index.htm>**



ALTBIB

Bibliography on Alternatives to Animal Testing



- **Bibliografía sobre Alternativas al Uso de Vertebrados Vivos en Investigación Biomédica y Ensayo, seleccionada a través de búsquedas en MEDLARS por expertos del Toxicology and Environmental Health Information Program (TEHIP) del Specialized Information Services Division (SIS) de la National Library of Medicine (NLM).**
- **También busca directamente en Pubmed**
- **Live PubMed Searches: Muy interesantes selecciones al día sobre las diferentes áreas de evaluación toxicológica**

<http://toxnet.nlm.nih.gov/altbib.html>

- AWI online:
- Refinamiento y Enriquecimiento Ambiental para todos los animales de laboratorio. Bases de datos del Instituto para el Bienestar Animal US



http://www.awionline.org/lab_animals/biblio/laball.htm

- Refinamiento: mejora en el bienestar animal y control de parámetros que incrementen la variabilidad
- Enriquecimiento ambiental: uso de estímulos que promuevan la expresión de conductas apropiadas de cada especie y actividades mentales

Modelos animales: ILAR



ILAR 

Institute for Laboratory Animal

[Home](#) [Current Projects](#) [Animal Models & Strains](#) [Books & Reports](#) [ILAR Journal](#) [Lab Co](#)

http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/search_amsst.shtml

Animal Models & Strains

Toxicología: Protocolos UE

- Textos completos gratuitos de los procedimientos oficiales de ensayo utilizados en la evaluación toxicológica de compuestos químicos en la Unión Europea
- <http://ecb.jrc.it/testing-methods/>
- O en documentación adjuntada en español

Juan Riego-Sintes'."/>

Testing Methods

HOME DOCUMENTS ANNEX V

Assessment of Chemicals
Biocides
Classification & Labelling
Existing

The Testing Methods work area provides support for chemical substances in the European Union, in close c...
Institutional Support, Competitive Research & Support...
Contact Person - Head of Sector: [Juan Riego-Sintes](#)

Toxicología: Protocolos OCDE

- Listado de los procedimientos oficiales de ensayo utilizados en al evaluación toxicológica de compuestos químicos en la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. Pueden adquirirse los protocolos
- http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html



Chemicals Testing: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Sections 1-5

REFERENCIAS

Bottrill K. A guide to searching for alternatives to the use of laboratory animals. Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments. <http://www.frame.org.uk/>

Bottrill, K. (2004). Search strategies on the internet: general and specific. ATLA-32S1,585-589.

<http://www.worldcongress.net/2002/proceedings/D5%20Bottrill.pdf>

Grune B, Dörendahl A, Köhler-Hahn D, Feuerstein C, Box R, Wohlgemuth H, Spielmann H (2004) New Sources for Alternative Methods on the Internet: The Objectives of Databases and Web Sites ATLA 32, Supplement 1, 573-582

Grune B, M Fallon, C Howard, V Hudson, J A. Kulpa-Eddy, J Larson, S Leary, A Roi, J van der Valk, M Wood, A Dörendahl, D Köhler-Hahn, R Box, H Spielmann (2004) Report and Recommendations of the International Workshop "Retrieval Approaches for Information on Alternative Methods to Animal Experiments" ALTEX 21, 3/04 115

Langley G, Broadhead C, Bottrill K, Combes B, Ewbank R, Hawkins P, Hubrecht R, Jennings M, Newman C, Rowe S, Southee J, Todd M, Ward L (1999) Accessing Information on the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experiments. Report and Recommendations of a Focus on Alternatives Workshop. ATLA 27, 239-245

Repetto G, del Peso A, Jos A, Moreno I, Cameán AM, Repetto M (2002) Innovación en la docencia de la toxicología mediante la aplicación de nuevas tecnologías. Revista de Toxicología 19:129-140.

Repetto G, Moreno I, del Peso A, Repetto M, Cameán AM (2001) La búsqueda de información toxicológica: módulo práctico de aprendizaje. Revista de Toxicología 18:92-98

Repetto G, Cameán AM, Castaño A, Jos A, González Muñoz MJ, Moreno IM, del Peso A, Pichardo S, Repetto M, Repetto MR, Ríos JC, Zurita J. Búsqueda e Interpretación de la Información Toxicológica. Módulo 21. En: "Ampliación de Toxicología de Postgrado". M. Repetto, ed. Area de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla, 2005.

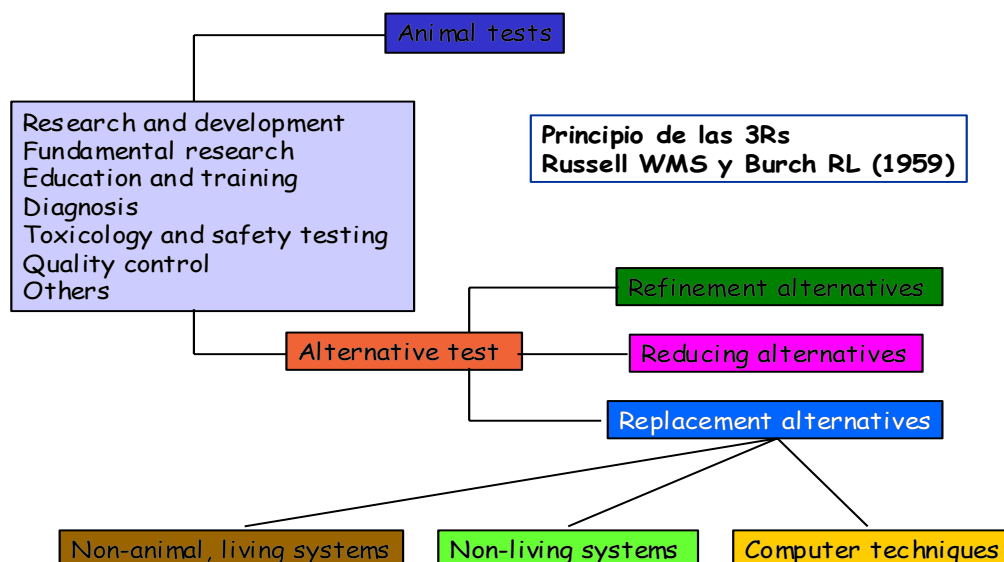
<http://www.us.es/toxicologia/alternativas.htm>

SESIÓN 4: REEMPLAZO

MÉTODOS ALTERNATIVOS: Estrategia experimental; conceptos generales.

Jose Vicente Castell y M^a José Gómez Lechón. Hospital La Fe Valencia

La importancia que los modelos animales han tenido hasta el presente en el avance de la investigación biológica, médica y veterinaria, es indiscutible. Sin embargo a lo largo de los años, tanto la sociedad como la comunidad científica se han sensibilizado sobre el uso racional del animal de laboratorio. El ámbito de utilización es amplio : investigación básica, biomédica y biotecnológica, en la industria farmacéutica, cosmética y química, estudios de impacto medioambiental y finalmente en la enseñanza. La opinión pública solicita la máxima garantía de todos los productos de consumo, pero a su vez exige que se reduzca la experimentación animal para evaluar la seguridad de dichos productos. Sobre la base de estas consideraciones surgió la necesidad de definir, crear y desarrollar **métodos alternativos** al uso de animales de laboratorio. La palabra alternativa no está específicamente definida en el mundo de la experimentación animal, sin embargo, ha sido necesario que los investigadores comprendan su significado en dicho ámbito. La definición comúnmente aceptada es la de métodos o sistemas biológicos, que, sin utilizar directamente seres vivos, son capaces de proporcionar una información científica equivalente y/o complementaria a la de aquellos. Así pues se consideran técnicas alternativas aquellos métodos o modelos que: 1) incorporan un **refinamiento** de los procedimientos, de modo que disminuyen el dolor o malestar de los animales, o bien aumentan su bienestar, 2) permiten una **reducción** en el número de animales para obtener la misma cantidad y calidad de información, y 3) facilitan el **reemplazo** del uso de animales por sistemas que no requieren seres vivos, o bien emplean otras especies animales que sean inferiores en la escala filogenética animal.



Debido que los tres objetivos a alcanzar con los métodos alternativos empiezan con la misma consonante, se les denominó las 3 Rs.

LAS 3 ERRES
Russell WMS y Burch RL (1959)

Desarrollo de modelos alternativos para:

↓ **Reemplazar** a los animales

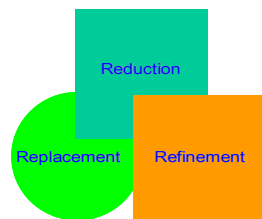
↓ **Reducir** el número de animales

↓ **Refinar** los métodos utilizados

No se conoce con precisión el origen de las 3 Rs pero el concepto se discutió en público por primera vez durante una reunión científica organizada por la *Universities Federation for Animal Welfare* (UFAW) en 1957. Debido al interés suscitado por este asunto, pidieron a los científicos W.M. Russell y R.L. Burch que se encargaran de su desarrollo bajo el patrocinio de organización estadounidense *Animal Welfare Institute center* (AWIC). Escribieron el magnífico libro *The principles of humane experimental technique*, publicada en 1959, que por desgracia solo tuvo una escasa repercusión en su momento, y fue en 1992 al publicarse una segunda edición cuando sus teorías sobre el uso racional del animal de laboratorio produjeron un gran impacto.

Art. 7.2: "... un determinado experimento no se realizará en animales, si existe otro método disponible que sea *razonable, realizable y científicamente satisfactorio* para obtener los mismos resultados y que no requiera el uso de animales..."

Art. 7.3: "... se seleccionará la especie y se utilizará el *mínimo número de animales* y aquel procedimiento que produzca *el mínimo y menos prolongado dolor y sufrimiento...*"



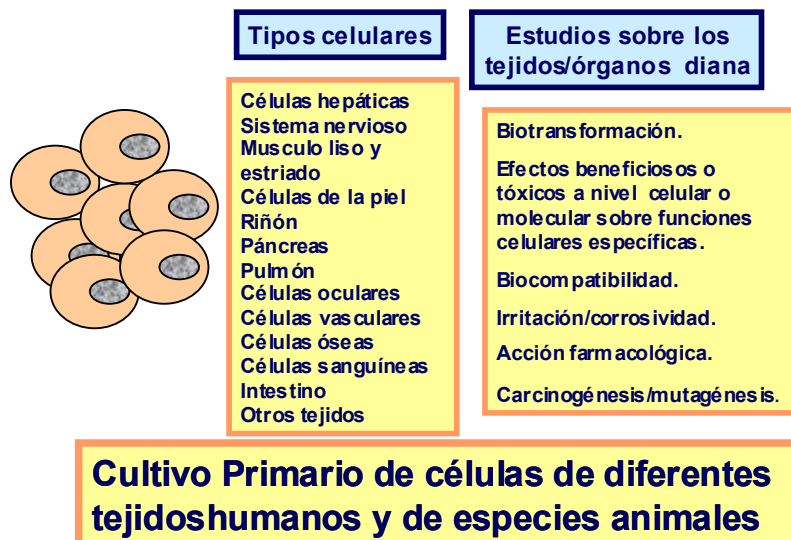
Parlamento Europeo
(Directiva 86/609/CEE)

Por su propia naturaleza los modelos *in vitro* son una simplificación de una realidad mucho más compleja que es el ser vivo, y por ello la información que son capaces de proporcionar es en ocasiones parcial. En estos casos deberíamos hablar de modelos complementarios a la experimentación animal. Sin embargo, los modelos *in vitro* tienen ciertas ventajas intrínsecas, dado que se necesitan cantidades muy pequeñas del compuesto lo que permite realizar diferentes tipos de estudios durante las etapas muy precoces del desarrollo de nuevas moléculas. En el caso de agentes químicos es posible clasificarlos y etiquetarlos de acuerdo a su potencial toxicidad para el hombre o los animales, o su impacto medioambiental. La biocompatibilidad de nuevos materiales desarrollados para prótesis, implantes u órganos artificiales también puede ser analizada utilizando modelos *in vitro*.

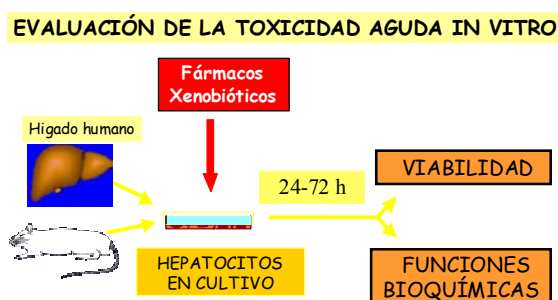
Los estudios toxicológicos que se llevan a cabo durante el desarrollo de un nuevo medicamento, producto cosmético, agente químico, biomaterial, etc. se realiza en animales de experimentación con el ánimo de detectar aquellos compuestos, o dosis, potencialmente tóxicas para el hombre. La toxicología *in vitro* es una aproximación nueva a este tipo de estudios. La extrapolación de los resultados experimentales observados *in vitro* a *in vivo* es, sin lugar a dudas, el aspecto crucial en la utilización de los modelos *in vitro* y que obliga a analizar con suma cautela los resultados obtenidos. Con todo ello, para el investigador, hoy en día, los modelos *in vitro* representan una herramienta extraordinariamente útil para anticipar la probabilidad de efectos adversos o no deseados de nuevos fármacos, de sus posibles interacciones con otros medicamentos, etc. dada su simplicidad, disponibilidad, bajo coste y el fácil control de múltiples factores y variables.

Estrategia para evaluar la toxicidad de xenobióticos *in vitro*.

La evaluación de la toxicidad *in vitro* requiere de una estrategia cuidadosa, que incluye varios factores a tener en cuenta para que la información obtenida pueda ser predictiva de la toxicidad *in vivo*: 1) *Uso de un sistema biológico adecuado* (cultivos primarios, co-cultivos, líneas celulares, células manipuladas genéticamente, cultivos organotípicos); 2) *Selección de los parámetros* para evaluar los efectos tóxicos; 3) *Extrapolación de los datos* obtenidos *in vitro* a *in vivo*.



Los estudios que se realizan para evaluar *in vitro* la potencial toxicidad de un compuesto entran en 4 categorías: 1) *Tests de citotoxicidad general*, destinados a evaluar efectos sobre funciones vitales de las células, para los cuales las líneas celulares de distintos tejidos y de diferentes especies existentes comercialmente constituyen un modelo celular adecuado; 2) *Test dirigidos a la detección de toxicidad órgano-específica*, es decir el efecto de los xenobióticos sobre funciones específicas del dicho órgano diana y en este caso la utilización de cultivos primarios de células diferenciadas del órgano diana es el modelo apropiado; 3) *Estudio del metabolismo* del compuesto utilizando cultivos de hepatocitos, y el posterior análisis del perfil de metabolitos; y finalmente 4) *Mecanismos de toxicidad* que subyacen a los efectos tóxicos observados.



De todos los xenobióticos con los que el hombre toma contacto a lo largo de su vida, no cabe duda de que los medicamentos son los de mayor importancia y cuya seguridad, que depende del balance del riesgo tóxico y del beneficio terapéutico, es analizada de forma muy cuidadosa. Sin embargo,

diferencias en el metabolismo, o susceptibilidad del ser humano en comparación con la especie animal utilizada en los ensayos preclínicos, suele ser la causa más frecuente del fracaso en el desarrollo de un nuevo fármaco. En este sentido, los modelos celulares *in vitro* derivados de células humanas están llamados a desempeñar un papel clave, puente entre los ensayos en animales y en humanos, permitiendo una investigación más directa de los efectos potenciales del nuevo compuesto sobre el destinatario final: el hombre.

Así pues, es evidente que la extrapolación de los resultados experimentales observados *in vitro* a *in vivo* es, sin lugar a dudas, el aspecto crucial en la utilización de los modelos celulares, y su valor predictivo depende de un análisis muy cuidadoso de la información obtenida *in vitro*. Los modelos *in vitro* proporcionan una información clara cuando de lo que se trata es de decidir cual entre una familia de compuestos es el menos tóxico en términos de concentración, o si un compuesto es más o menos tóxico que otro. En cualquier caso, el grado de aproximación y por lo tanto la probabilidad de que un fármaco sea tóxico *in vivo* está en función de la calidad de los resultados obtenidos y de una correcta interpretación. Es decir, de la sensibilidad del modelo (células animales versus células humanas), de la farmacocinética del compuesto, de la relevancia y de la reversibilidad del efecto observado.

Test para estudios de toxicidad

El ensayo de toxicidad, labor básica durante el desarrollo de todo nuevo compuesto, tiene un doble objetivo: eliminar aquellos manifiestamente tóxicos, y detectar posibles efectos secundarios antes de su contacto con el hombre o su uso clínico. El punto de partida consiste en determinar la máxima concentración de un compuesto compatible con la supervivencia de las células. A continuación deberá investigarse los posibles efectos de concentraciones sub-citotóxicas del compuesto en estudio sobre funciones bioquímicas específicas de las células del órgano diana en cultivo primario (hepatocitos, neuronas, células endoteliales, células renales, etc). Con la evaluación conjunta de estos indicadores bioquímicos se pretende conseguir una visión general y amplia del grado y nivel de interferencia que produce un xenobiótico en el metabolismo de las células del órgano diana.

Diseño experimental para evaluar la toxicidad *in vitro*

Evaluación de los parámetros adecuados
para estudiar los efectos tóxicos

Estudios de citotoxicidad general: Efectos sobre funciones vitales de la células.

Ensayos de viabilidad celular
(MTT, RN, LDH, GOT, GPT, ATP, etc)
Determinar la máxima concentración no tóxica
(MCNT), y las IC₁₀ e IC₅₀

Toxicidad órgano-específica: Efectos sobre funciones diferenciadas de las células del órgano diana.

Evaluación de funciones diferenciadas a concentraciones sub-cito tóxicas

Mecanismos moleculares de toxicidad

Secuencia de eventos y marcadores de muerte celular por apoptosis y necrosis.

Indicadores pre-letales del estrés celular

- Depleción de **glutathion**
- Transducción de señal del estrés pre-apoptótico/necrótico (ejm: nrf-2, AP-1, translocación del factor de transcripción NF-κB)
- Adaptaciones celulares (ejm: enzimas antioxidantes, **hiperpolarización de la membrana mitocondrial**, biogénesis mitocondrial)
- Alteraciones de **ATP y homeostasis del calcio**
- Alteraciones de la funcionalidad celular (ejm: proliferación, autofagocitosis de orgánulos intracelulares irregulares)

Muerte celular por apoptosis y activación de caspasas

- Fragmentación y abultamiento de las mitocondrias
- Disgregación del citoesqueleto y digitaciones de la membrana plasmática
- Fragmentación de ADN por endonucleasas y condensación de la cromatina
- Localización de fosfatidilserinas en la superficie celular

Muerte celular por necrosis

- Abultamiento de las células y de los orgánulos subcelulares
- Lisis celular con liberación de enzimas intracelulares (ejm: lactato deshidrogenasa (LDH))

Xu JJ y col. Chemo-Biological Interactions (2004) 150:115-128

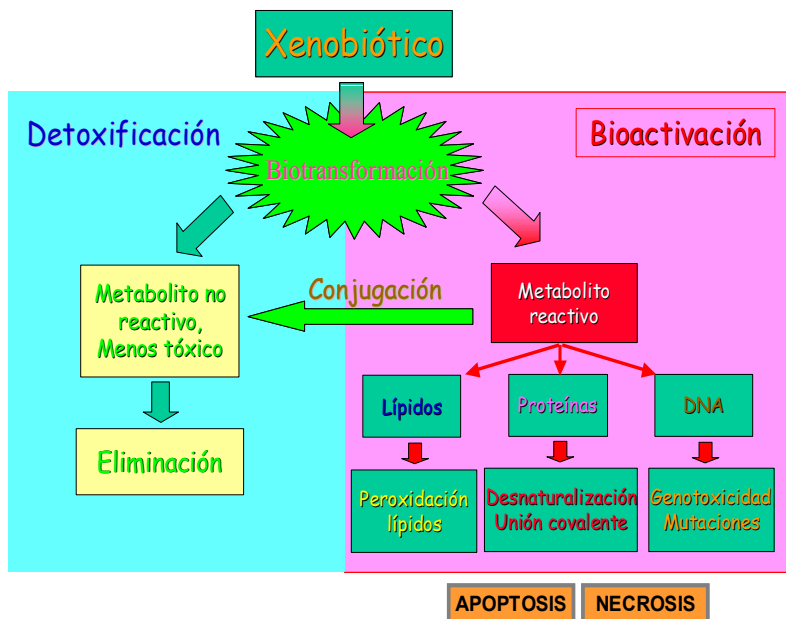
Toxicidad como consecuencia del metabolismo de los xenobióticos.

El hígado es el órgano que posee la mayor capacidad biotransformadora del organismo. Por ello desempeña un papel clave en el metabolismo de los xenobióticos mediante el conjunto de reacciones enzimáticas destinadas a aumentar la solubilidad de los xenobióticos (Fase I: reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis) y a facilitar su eliminación, globalmente (Fase II: conjugación con moléculas endógenos polares) conocidas como biotransformación. Las reacciones de biotransformación no siempre conllevan un proceso de detoxificación, ya que en ocasiones dan lugar a

especies reactivas de oxígeno y/o a metabolitos intermediarios, que pueden ser incluso mas tóxicos que el compuesto original. Así pues, el metabolismo de un compuesto y la generación de metabolitos reactivos como consecuencia de él puede ser precisamente la causa de su toxicidad para el organismo.

Por lo general el daño producido por xenobióticos conduce a un tipo de muerte celular conocido como necrosis, que es precedida por una alteración drástica de la homeostasis celular, y acompañada de cambios en la morfología de las organelas citoplásmicas, aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y salida de componentes citosólicos al espacio extracelular, y un proceso inflamatorio en las áreas circundantes.

El otro tipo de muerte celular, apoptosis, se caracteriza por una condensación progresiva de la cromatina nuclear, colapso celular con pérdida de contacto entre células vecinas, y ruptura de la célula con la formación de vesículas acidófilas conocidas como cuerpos apoptóticos. Hay cada vez más evidencias que muestran que la mayoría de los compuestos capaces de producir necrosis de los hepatocitos, pueden también iniciar un proceso apoptótico. De hecho, hay pocas evidencias de que la necrosis inducida por fármacos en el hígado ocurra en total ausencia de apoptosis.



Mecanismos moleculares generales en la hepatotoxicidad mediada por fármacos.

Dado que entre el hombre y los animales existen diferencias significativas en cuanto al modo de metabolizar los xenobióticos, los

resultados obtenidos con animales de laboratorio, aún siendo de gran valor en la evaluación del riesgo tóxico, no son siempre extrapolables en un 100% al hombre. La literatura médica está llena de ejemplos de efectos tóxicos, por el uso de fármacos considerados como seguros en los test rutinarios con animales. Por tanto, antes de la administración de un medicamento sería importante disponer de la máxima información posible sobre el metabolismo que sufre durante su tránsito por el organismo, con objeto de poder valorar las consecuencias (farmacocinéticas, farmacodinámicas, toxicológicas) derivadas del mismo. En este sentido, los hepatocitos humanos en cultivo primario constituyen el modelo idóneo, mas próximo al hombre para poder anticipar el metabolismo de un determinado compuesto en el ser humano. Ello es de gran ayuda para poder elegir la especie animal que se va a comportar frente a ese compuesto de forma mas próxima al hombre, y en consecuencia realizar en ella los estudios de toxicidad y metabolismo, tanto *in vitro* como *in vivo*.

El objetivo principal de los estudios de metabolización de fármacos es conocer el patrón de metabolización (metabolitos mayoritarios, metabolitos tóxicos, velocidad y grado de metabolización, parámetros cinéticos). No obstante, el análisis de los factores que pudieran influir sobre el metabolismo resulta también un objetivo a destacar. En este sentido es importante el estudio de posibles interacciones medicamentosas (inducción/inhibición), o de la variabilidad entre diferentes grupos de población (polimorfismo, patologías, edad) e incluso, profundizando un poco más en el estudio del metabolismo de un fármaco en particular, puede establecerse como objetivo la identificación de las enzimas (CYPs) implicadas de forma específica en su metabolización. Estos estudios que se pueden abordar utilizando diferentes modelos experimentales *in vivo* (estudios clínicos, animales), con dificultad y/o elevado costo económico, pueden también realizarse *in vitro* (órgano aislado, slices, células aisladas o en cultivo, sistemas celulares manipulados genéticamente capaces de expresar un transgen de interés, tal es el caso de los CYPs, fracciones subcelulares, enzimas purificadas, simulación por ordenador) con gran facilidad, teniendo en cuenta de que cada uno de ellos presenta una serie de características particulares y permite obtener un determinado nivel de información.

Para el investigador, hoy en día, los modelos *in vitro* representan la mejor herramienta para abordar los estudios cinéticos, mecanísticos y de regulación de la biotransformación de xenobióticos, dada su simplicidad, disponibilidad, bajo coste y el fácil control de múltiples factores y variables.

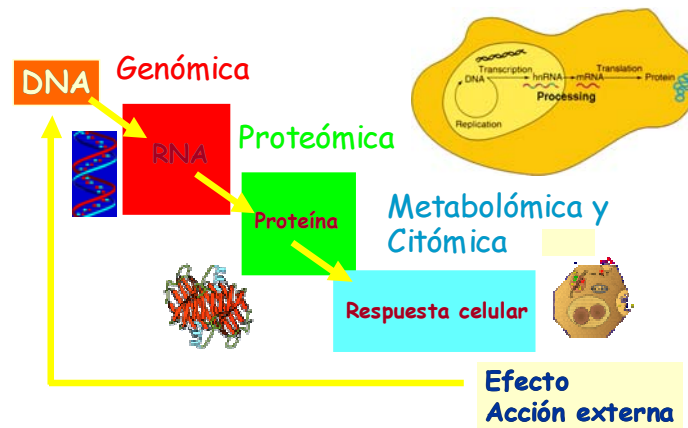
¿Que información pueden aportar los modelos celulares en estudios toxicológicos preclínicos?

Los modelos celulares constituyen una alternativa capaz de reemplazar a los animales para determinados estudios del desarrollo pre-clínico, o de complementar los estudios realizados con éstos. En cualquier caso, su utilización contribuye sin lugar a dudas a mejorar el diseño de los estudios pre-clínicos, a aumentar la seguridad en la futura administración del fármaco en las fases clínicas, y son de gran ayuda para la toma de decisiones durante el desarrollo, hasta el punto de detenerlo, si los estudios así lo aconsejaran, con el ahorro en tiempo y costo económico que ello puede representar en el la inversión global que requiere llevar a término el desarrollo de un nuevo fármaco.

Son varios los modelos celulares de los que se dispone, y debe realizarse una elección adecuada del tejido y la especie, así como un diseño experimental correcto para responder a cada una de las preguntas durante el desarrollo de un fármaco. Es evidente que la extrapolación *in vivo* de los resultados experimentales observados *in vitro* es, sin lugar a dudas, el aspecto crucial en la utilización de los modelos celulares. Su valor predictivo, en la evaluación del riesgo de toxicidad para el hombre de nuevas moléculas, depende de un análisis muy cuidadoso de la información obtenida *in vitro* y de su correcta elaboración e interpretación. En líneas generales, se pueden enumerar varios aspectos en los que la contribución de los estudios *in vitro* pueden ser clave:

- a) Clasificar y ordenar un grupo de moléculas candidatas potenciales para desarrollo en función de su toxicidad molar. Ello permite identificar los candidatos más seguros, es decir, seleccionar de un grupo de aquéllas moléculas farmacológicamente activas y que a su vez manifiesten menor toxicidad.
- b) Investigar los efectos de las moléculas sobre funciones bioquímicas específicas del órgano diana y sobre mecanismos moleculares responsables de la toxicidad: efectos a nivel del genoma (genómica), de la expresión proteica (proteómica), sobre la síntesis de metabolitos endógenos (metabolómica), y sobre funciones bioquímicas o estructuras específicas del órgano diana (citómica), así como los mecanismos moleculares responsables de la toxicidad.

Nuevas tecnologías OMICAS para el estudio de nuevos fármacos



- c) Estimar *in vitro* la máxima concentración no tóxica de una molécula dada. Se puede estimar el riesgo y la toxicidad potencial *in vivo*, en caso de que la molécula tomara contacto con las células diana a concentraciones superiores a la máxima concentración no tóxica.
- d) Estudiar y predecir en humanos el metabolismo de nuevos fármacos (metabolitos mayoritarios, metabolitos tóxicos, velocidad y grado de metabolización, parámetros cinéticos).
- e) Identificar en humanos la(s) isoenzima(s) del citocromo P450 implicadas de forma específica en el metabolismo de una molécula dada, así como identificar las isoformas del P450 implicadas en la producción de cada uno de los metabolitos.
- f) Analizar factores que pudieran influir sobre el metabolismo: el estudio de posibles interacciones medicamentosas y el potencial efecto inducción/inhibición del fármaco sobre las isoenzimas del citocromo P450.
- g) Ayudar a elegir la especie animal que se comporta de forma más parecida al hombre, desde el punto de vista del metabolismo, frente a un compuesto determinado para realizar estudios toxicológicos.
- h) Es posible simular experimentalmente situaciones difíciles de analizar en modelos animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS PARA CONSULTA

Castell J. V., M. J. Gómez-Lechón, X. Ponsoda y R. Bort. In vitro investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity. En: *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. J. V. Castell y M. J. Gómez-Lechón, eds. Chapter 8. pp. 375-432. Academic Press. London (1997)

Castell J.V., R. Jover, R. Bort, and M. J. Gómez-Lechón. The challenge of using hepatic cell lines for drug metabolism studies. En: *Proceedings of COST B1 European Symposium on the prediction of drug metabolism in man : Progress and problems*. European Commission. A. R. Boobis, P. Kremers, O. Pelkonen and K. Pithan, Eds. Pp. 77-92. Liege (1998).

Donato M. T., J.V. Castell and M. J. Gómez-Lechón. Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices. Comparison with other hepatic cellular models. *J. Hepatol.* 31 :542-549 (1999)

Gómez-Lechón M.J., Donato M.T., X. Ponsoda, R. Jover and J.V. Castell Experimental in vitro models to evaluate hepatotoxicity. En: *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Chapter 4. pp. 85-108. J.V. Castell and M.J. Gómez-L. eds. Ed. Farmaindustria, Madrid (1992).

Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P-450s in hepatocytes. Application to induction studies. C. Rodríguez-Antona, R. Jover, M.J. Gómez-Lechón, and José V. Castell *Arch. Biochem. Biophys.* 376:109-116 (2000)

An assessment of human liver-derived in vitro systems to predict the in vivo metabolism and clearance of almokalant. Andersson TB, Sjöberg H, Hoffmann K-J, Boobis AR, Watts P, Edwards RJ, Lake BG, Price RJ, Renwick AB, Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Ingelman-Sundberg M, Hidestrand M, Goldfarb PS, Lewis DFV, Corcos L, Guillouzo A, Taavitsainen P, Pelkonen O. *Drug Metab Disp* 29: 712-720 (2001).

Human hepatic cell cultures: In vitro and In vivo drug metabolism. M.J. Gómez-Lechón, M.T. Donato, X. Ponsoda, and J.V. Castell. *ATLA* 31: 1-9 (2003)

Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. M. J. Gómez-Lechón, M. T. Donato, J. V. Castell and R. Jover. *Curr Drug Metab.* 4:292-312 (2003).

Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. M. J. Gómez-Lechón, M.T. Donato, J.V. Castell and R. Jover *Curr Drug Metab.* 5:443-462 (2004).

Drug metabolism by cultured human hepatocytes: How far are we from the in vivo reality? X. Ponsoda, M. T. Donato, G. Perez-Cataldo, M. J. Gómez-Lechón y J. V. Castell. *ATLA* 32: 101-110 (2004)

LIBROS

IN VITRO ALTERNATIVES TO ANIMAL PHARMACOTOXICOLOGY. ISBN 84-87896-03-0. pp. 85-108. J.V. Castell and M.J. Gómez-Lechón. eds. Ed. Farmaindustria, Madrid (1992).

IN VITRO METHODS IN PHARMACEUTICAL RESEARCH. ISBN 0-12-163390-X. . J. V. Castell y M. J. Gómez-Lechón, eds. Academic Press. London (1997)

CITOCROMO P-50. ISBN 84-85559-76-2. María Cascales Angosto y M^a José Gómez-Lechón, eds. INSTITUTO DE ESPAÑA Y REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. Madrid (2004).

LAS OMICAS: GENOMICA, PROTEOMICA, CITOMICA Y METABOLOMICA. NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA EL DESARROLLO DE FÁRMACOS. ISBN 84-932423-8-1. María Cascales Angosto, M^a José Gómez-Lechón y Enrique O' Connor, eds. INSTITUTO DE ESPAÑA Y REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. FUNDACIÓN JOSÉ CASARES GIL. Madrid (2005).

REEMPLAZO: PROCESO DE VALIDACIÓN. ORGANISMOS COMPETENTES. MÉTODOS CIENTÍFICAMENTE ACEPTADOS Y VALIDADOS.

Pilar Prieto. ECVAM, Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Center, European Commission, 21020 Ispra (Va), Italy

La validación de métodos alternativos es el proceso a través del cual se establece la *reproducibilidad y fiabilidad* de un método de ensayo con un propósito concreto. El Centro de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) que se creó en octubre de 1991 a raíz de una comunicación de la Comisión Europea al Congreso y al Parlamento Europeo como respuesta a la *Directiva 86/609/EEC*, ha establecido en los últimos 12 años en colaboración con expertos internacionales, las líneas guía para la validación. Una de las tareas principales de ECVAM es la de coordinar a nivel europeo la validación de métodos alternativos, que tienen como finalidad el refinamiento (perfeccionamiento) de los métodos de experimentación animal, la reducción en el número de animales empleados o el reemplazo de los métodos por otros que no requieran el uso de animales de laboratorio siendo su ámbito de aplicación en diferentes campos de las Ciencias Biomédicas. Inicialmente se identificaron 5 etapas en la evolución de métodos de ensayo: desarrollo, prevalidación, validación, evaluación independiente y aceptación reguladora. Estas cinco etapas forman lo que se conoce como proceso de validación prospectiva, proceso que ha resultado satisfactorio puesto que mediante su aplicación 8 métodos de ensayo se han validado científicamente y de estos 5 métodos están ya aceptados a nivel regulador. Recientes avances en nuevas tecnologías como la genómica y la proteómica, modelos QSARs, sistemas expertos, etc. han impuesto la necesidad de adaptar el proceso de validación a la nueva generación de métodos y modelos de ensayo. Es por esta razón que el ECVAM ha propuesto

recientemente la adopción de un sistema modular que permitirá añadir flexibilidad al proceso de validación. En este sistema se han identificado 7 módulos independientes (definición del método de ensayo, variabilidad intra laboratorio, transferencia del método, variabilidad inter laboratorio, capacidad de predicción, dominio de aplicación, patrones de cumplimiento) que permiten obtener la información necesaria para poder establecer la validez científica de un método de ensayo antes de proceder a su evaluación independiente y posterior aceptación reguladora. La información puede obtenerse de modo prospectivo, retrospectivo o mediante una combinación de los dos. Finalmente se pueden enumerar las distintas organizaciones que de algún modo están implicadas en el proceso de validación: *ECVAM* en Europa e *ICCVAM* (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) en USA son las autoridades competentes; *ZEBET* (Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments) en Alemania, *FRAME* (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments) en UK y *CAAT* (Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing) en USA son organizaciones especializadas en validación; y por ultimo caben destacar otras organizaciones que contribuyen activamente al concepto de las 3R's, como son *NCA* (The Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use) en Holanda, *SIAT* (The Swiss Institute for Alternatives to Animal Experiments) en Suiza y *ECOPA* (European Consensus-Platform for Alternatives) en Europa.

MODELOS ALTERNATIVOS EN LA ENSEÑANZA.

Adela López de Ceráin. *Universidad de Navarra.*

Eugenio Vilanova. *Universidad Miguel Hernández.*

La estrategia de las 3Rs -reducción, refinamiento y reemplazo de animales de experimentación- se aplica también al ámbito de la docencia, tanto en la enseñanza secundaria como en la universitaria. Se va a comentar la situación de los métodos alternativos en los estudios de grado y de postgrado de la universidad española: situación actual, problemas, fuentes de información, posibilidades de mejora, experiencias de universidades.

Conviene hacer una distinción entre lo que son estudios de grado de las diversas licenciaturas biosanitarias y afines, y los estudios de postgrado, bien sean en forma de máster o doctorado. Diversas asignaturas de las licenciaturas de Ciencias han utilizado tradicionalmente animales de experimentación para realizar prácticas con los alumnos, como por ejemplo en Fisiología, Farmacología o Anatomía. El alto número de alumnos por curso en algunas universidades así como los objetivos docentes que se persiguen con las prácticas y las nuevas opciones que proporcionan los métodos alternativos, hacen replantearse a muchos profesores la necesidad de realizar otro tipo de prácticas durante la licenciatura. Situación distinta se presenta con aquellos alumnos que se inician por ejemplo en la investigación mediante la realización de una tesis doctoral. Si la tesis va a requerir de experimentación animal, es imprescindible que el alumno se forme de manera adecuada en la manipulación de la especie o especies animales que vaya a utilizar, y para ello será imprescindible que reciba entrenamiento por personal especializado. Estas prácticas, que realizará siempre un grupo de alumnos reducido y motivado, sí requerirá de modelos animales sobre los que se trabajará con los requerimientos de reducción y refinamiento; en ocasiones puede ser posible disponer también de algún modelo mecánico sobre el que se puedan ensayar previamente ciertas maniobras.

El primer taller sobre alternativas al uso de animales en educación superior tuvo lugar en el año 1998 y fue promovido por el grupo de trabajo sobre educación del Netherlands Centre Alternatives to Animal Use (NCA), Utrecht. Las recomendaciones y el informe resultante de esa reunión se publicaron en la revista *ATLA* en el artículo que se adjunta (Van der Valk, J., *et al.*, 1999). Una de las principales conclusiones era que existía en ese

momento poca información sobre las posibles alternativas disponibles que se podían utilizar en la educación superior, así como un desconocimiento bastante amplio por parte de los docentes de las ventajas pedagógicas y económicas de dichas alternativas. Ello constituyó el punto de partida para la creación del proyecto EURCA (*European Resource Centre for Alternatives in Higher Education*) cuyo objetivo es diseminar de manera efectiva información sobre alternativas en educación superior, así como promover la utilización de dichas alternativas a través de actividades de mayor alcance. Entre las actividades de EURCA destaca el mantenimiento de una página web (<http://www.eurca.org/>) que contiene una base de datos sobre alternativas. En dicha base de datos existe actualmente información sobre más de 70 alternativas clasificadas en función de tres criterios: tipo de alternativa (programas de ordenador, modelos de maniquí, videos, sitios web), categoría (anestesia, anatomía, farmacología ...hasta 11) y proveedor. El acceso a la información es fácil y rápido y la principal ventaja es que más de la mitad de los productos disponen de un informe realizado por una persona independiente que comenta su experiencia con el modelo, ventajas y desventajas y aplicabilidad en la docencia. EURCA dispone de una serie de personas de contacto en los distintos países de la Unión Europea; en España, la Prof. Pilar Vinardell de la Universidad de Barcelona.

La base de datos NORINA, a la que se puede acceder desde la dirección http://oslovet.veths.no/fag.aspx?fag=57&mnu=databases_1, comprende información más amplia que la anterior sobre alternativas en la enseñanza (3500 aproximadamente). Esta información recogida desde el año 1991, está clasificada en 22 categorías e incluye los distintos tipos de alternativas: modelos tridimensionales, videos, DVD, modelos de ordenador, etc. Se complementa con otra base de datos llamada Textbook a la que se accede desde la misma página web, con información sobre libros de ciencias del animal de laboratorio. Aunque esta base se mantiene actualizada algunos inconvenientes de NORINA son: no todas las productos son adecuados para la enseñanza universitaria, algunos son bastante antiguos y resulta difícil comprender en qué consisten, ya que no existe ningún tipo de demostración o evaluación por parte de docentes que hayan probado el sistema. Algunos productos son prestados de otras bases de datos con las que está interrelacionada como INTERNICHE *The International Network for Humane Education* (<http://www.interniche.org>) o HSUS *The Humane Society of United States* (<http://www.hsus.org>).

Las dos páginas comentadas son las que contienen más información sobre sistemas de enseñanza que sustituyan los animales en la docencia. Otras

páginas web sobre alternativas con información general que pueden contener información de interés para la enseñanza son las siguientes:

- <http://www.frame.org.uk/> Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments
- <http://caat.jhsph.edu/> John Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing
- <http://altweb.jhsph.edu/> Alternatives to Animals Web Site

SESIÓN 5: EXPERIENCIA DE LOS COMITÉS ÉTICOS Y CONCLUSIONES.

EXPERIENCIA DE LA APLICACIÓN DE LAS 3R'S EN LOS COMITÉS DE ÉTICA: CASOS PRÁCTICOS

Jordi Cantó. Servei d'Estabulari / Universitat Autònoma de Barcelona

Consol Fina. Asociación Nacional para la Defensa de los Animales y "Eurogroup for Animal Welfare" Bruselas.

Nuria Basi. Miembro de la Junta Directiva de REMA

Entre los temas relacionados con el bienestar animal, el uso de animales en la experimentación ocupa un lugar importante por su complejidad y los problemas éticos que presenta. Hoy la sociedad pide soluciones factibles, fórmulas preventivas y bienestar animal, no como concesión bondadosa, actualmente se considera como práctica de justicia moral.

La introducción de los aspectos éticos en la legislación vigente y la adopción de los principios de las 3R's ha reafirmado una nueva consciencia sobre el uso racional y limitado de los animales de experimentación

La formación específica para los científicos y personal involucrado en el uso y trato de animales; estar al día de los avances de los estudios de las necesidades de cada especie; el conocimiento de sus características biológicas y un alojamiento y mantenimiento apropiados, son fundamentales para el bienestar de los animales.

La creación de los Comités Éticos de Experimentación animal (CEEA) de los centros usuarios y las Comisiones de Ética de las correspondientes Administraciones. Pueden garantizar la correcta aplicación de la Ley, informar, dialogar con los investigadores, promover la reflexión ética, la atención a las 3R's y a los métodos alternativos y ha sido otro de los elementos importantes a añadir al proceso de valoración de la vida animal.

Todo ello, claro está, requiere Motivación y Responsabilidad, la 4R, (la cuarta R), pero es quizás uno de los más importantes puntos, junto con los **Métodos Alternativos**, para avanzar en un propósito que cada día cobra mayor alcance, es decir, la conciliación de las necesidades humanas y

también animales, en este campo, con el deber ético de no causar daño a seres vivientes.

La experiencia de muchos años de trabajo en la Comisión de la Generalitat de Cataluña, nos muestra, y está confirmado por los mismos profesionales, que lo que al inicio pareció algo difícil de aplicar, gracias al diálogo, la colaboración y un esfuerzo de comprensión, hoy el investigador es el primero que busca fórmulas éticas de trabajo y aplica los consejos e información del Comité. Pero es necesario proseguir para avanzar cada día mas y hacer que se convierta en una pauta habitual para todos.

Esta presentación quiere poner de manifiesto el importante papel que pueden y deben desempeñar los Comités Éticos de los centros usuarios y las Comisiones de Ética de las administraciones estatal y autonómicas en la aplicación de las 3Rs

Los casos que se plantean, con las lógicas limitaciones derivadas de la confidencialidad a la que nos obliga la legislación sobre el tema, corresponden a la experiencia de 11 años de funcionamiento del Comité Ético de la UAB (con cerca de 550 protocolos evaluados) y de 8 años de trabajo de la Comisión de la Generalidad de Cataluña, que ha revisado unos 1.000 protocolos que requerían autorización expresa, un 30% de los más de 3.200 protocolos presentados en total por los aproximadamente 80 centros registrados. El total de protocolos revisados ha sido en realidad mucho mayor, debido al requerimiento legal de volver a evaluar cada dos años aquellos procedimientos que necesiten seguir llevándose a cabo, lo que implica que muchos de ellos se han revisado en 2, 3 y hasta 4 ocasiones.

Únicamente en la fase inicial del requerimiento de evaluación y aprobación de los procedimientos por parte de los Comités Éticos se detectó y denegó la autorización para realizar algún proyecto por considerar que los objetivos propuestos no justificaban (balance ético) el impacto que sobre el bienestar animal provocaría el diseño experimental propuesto.

En otros pocos casos, se ha requerido a los centros que eviten el uso de animales y utilicen métodos alternativos:

- Estudios de irritación dérmica y ocular primaria en conejo para productos no finales
- Test de pirógenos en conejo
- Test de fototoxicidad

- Test de la DL50
- Algunos procedimientos de prácticas docentes en los que se ha considerado que existían alternativas que permitían alcanzar los mismos objetivos sin utilizar animales

Resulta lógico pensar que el propio filtro que aplica el personal investigador al analizar si existen métodos alternativos al procedimiento que quiere proponer provoque este efecto de que no abunden los supuestos de denegación de autorización por existir métodos alternativos.

Más frecuentes han sido los casos en que se ha informado desfavorablemente el procedimiento debido a que la memoria presentada no facilitaba información o justificación suficientes sobre distintos aspectos críticos, entre los que cabría destacar:

- Objetivos poco claros o mal definidos
- No justificación de los beneficios que se derivarían de la realización del procedimiento
- Información insuficiente sobre posibles métodos alternativos
- Falta de concreción en el diseño y las técnicas experimentales a utilizar: ¿qué se hará, cómo se hará, cuándo se hará, cuántas veces se hará...?
- No justificación de la especie o del número de animales a utilizar
- Protocolos anestésicos incorrectos
- No aplicar protocolos analgésicos sin justificación
- Falta de protocolos de supervisión detallados
- No establecer criterios de punto final
- Técnicas eutanásicas no adecuadas

Estos aspectos, directamente relacionados con la reducción y el refinamiento, han sido los que más se han trabajado mediante distintas estrategias:

- Organización de jornadas dirigidas a los miembros de los Comités Éticos para formarlos en distintos aspectos: análisis estadístico para establecer el número de animales, protocolos anestésicos y analgésicos, supervisión del bienestar de los animales, técnicas eutanásicas...
- Sesiones específicamente dirigidas a los responsables docentes de prácticas con animales para informarles de los distintos aspectos relacionados con los métodos alternativos: dónde y cómo buscarlos,

cuáles existen, ventajas éticas, organizativas y económicas de su aplicación...

- Elaboración de un modelo para notificar los procedimientos en el que se requiere información específica y completa para cada uno de los aspectos más relevantes

El trabajo realizado por estos Comités y Comisiones, conjuntamente con los otros aspectos requeridos por la legislación (registro de los centros usuarios que deben reunir unas condiciones adecuadas, formación específica de todo el personal, creación de la figura del Asesor en Bienestar Animal, procedencia controlada de los animales, registro de las actividades desarrolladas, supervisión por parte de la Administración) ha comportado pues importantes mejoras en la reducción de los animales utilizados y en el refinamiento en su uso en aquellos casos en que aún no se dispone de alternativas.