



Acta Bioethica

ISSN: 0717-5906

info@actabioethica.cl

Universidad de Chile

Chile

Rodríguez Yunta, Eduardo

Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas

Acta Bioethica, vol. 13, núm. 1, 2007, pp. 25-40

Universidad de Chile

Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55413104>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

 redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES HUMANAS

Eduardo Rodríguez Yunta*

Resumen: El presente artículo reflexiona sobre las implicaciones éticas de usar modelos animales para el desarrollo de la medicina en seres humanos. Entre las posturas extremas de condenar toda investigación con animales considerándola irrelevante y la de exagerar y promocionar el importante papel de la investigación con animales como modelo para enfermedades humanas, se adopta la postura intermedia de considerar el uso de animales en investigación como necesario en el estado actual de la ciencia para ajustarse al imperativo moral de curar y prevenir enfermedades humanas, pero buscando formas de reemplazar y reducir el número de animales y de disminuir su sufrimiento.

Palabras clave: bioética, modelo animal, dolor y sustrato moral en los animales

ETHICS OF RESEARCH WITH ANIMAL MODELS FOR HUMAN DISEASES

Abstract: This paper argues about the ethical implications of using animals as models for human medicine development. This reflection adopts an intermediate stand between the extreme positions of condemning all research with animals, considering it irrelevant, and that of exaggerating and promoting research with animals as models for human diseases. Our stand considers that in the current scientific state, research with animals is necessary for adjusting to the moral imperative of curing and preventing human diseases, but methods for replacing and reducing the number of animals as well as diminishing their suffering must be sought.

Key words: bioethics, animal model, pain and moral status in animals

ÉTICA DA PESQUISA EM MODELOS ANIMAIS DE ENFERMIDADES HUMANAS

Resumo: O presente artigo reflete sobre as implicações ética de usar modelos animais para o desenvolvimento da medicina em sereres humanos. Entre as posturas extremas, uma é a de condenar todas as pesquisas com animais, considerando-a irrelevante e a outra postura, é a de exagerar e promover o importante papel da pesquisa com animais como modelo para enfermidades humanas. Adota-se uma postura intermediária de considerar o uso de animais em pesquisa, como necessária para o estado atual da ciência para se ajustar ao imperativo moral de curar e prevenir enfermidades humanas, porém buscando formas de substituir e reduzir o número de animais e de diminuir seu sofrimento.

Palavras chave: Bioética, modelo animal, dor e substrato moral nos animais

* Doctor en Biología Celular y Molecular, Master en Teología, Especialidad Ética. Investigador del Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética, Universidad de Chile, Chile
Correspondencia: rodrigue@chi.ops-oms.org

Introducción

La medicina científica nace con la observación y la experimentación en animales. Desde las experiencias de William Harvey, que comparó el latido cardíaco en distintas especies, los datos obtenidos mediante experimentos en animales han sido tema permanente de interés científico. Los modelos animales de enfermedades humanas han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación, constituyendo uno de los pasos fundamentales en la biomedicina. Se requieren tanto para proyectos de investigación como en pruebas diagnósticas y terapéuticas y en los controles de productos farmacológicos. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) expresaba en su XI Reunión Interamericana de 1980: "los países que han logrado un gran avance en el control de las enfermedades humanas y animales son aquellos que han establecido entidades que se dedican al mejor desarrollo de la Ciencia de los Animales de Laboratorio". Este avance, sin embargo, debe ir asociado al cumplimiento de normas éticas. En esa línea, la Ciencia de los Animales de Laboratorio fue creada para ayudar a la comunidad científica a mejorar todos los aspectos concernientes a la experimentación animal.

Los experimentos con animales tienen su fundamento en el hecho de considerar a otras especies animales como modelos en miniatura de los problemas humanos. Se realizan experimentos con animales básicamente en tres campos: la docencia, la industria y la investigación.

En docencia, las prácticas con animales tienen como objetivo aprender ciertos procesos fisiológicos, características anatómicas o adquirir habilidades clínicas y quirúrgicas como forma de entrenamiento.

En la industria, la biotecnología animal ha experimentado un gran desarrollo en las

últimas décadas con el uso de tecnologías reproductivas, la creación de organismos genéticamente modificados, la producción masiva de moléculas de interés y la prueba de productos de consumo para probar que no son dañinos.

En investigación, se han desarrollado modelos de animales para evaluar enfermedades genéticas humanas y producir drogas o vacunas, y como fuente donante de células y órganos, así como proteínas sanguíneas o anticuerpos.

En el presente artículo, junto con mostrar algunos apuntes sobre el estado de la ciencia, se presenta una reflexión sobre la controversia ética de la relativa aplicabilidad de los modelos animales para resolver problemas terapéuticos y de diagnóstico de enfermedades humanas, y la imposición del ser humano como especie para tratar a los animales como medios, no como fines.

Necesidad de usar modelos animales

En gran medida, gracias a la investigación en animales los científicos han descubierto maneras de sanar enfermedades y prolongar la vida humana. Por ejemplo, la creación de vacunas (poliomielitis), el desarrollo de los trasplantes de órganos, las transfusiones de sangre, la diálisis para los pacientes de riñón, técnicas quirúrgicas y de traumatología y el valor terapéutico de las medicinas modernas, que se prueban primero en animales. Esta investigación ha servido también para conocer el funcionamiento de los sistemas orgánicos, debido a que existen semejanzas significativas entre los sistemas fisiológicos de los seres humanos y los de varias especies animales. Mucho de lo que sabemos sobre el sistema inmune se ha obtenido de los estudios con los ratones. La investigación con perros ha proporcionado abundante información sobre el sistema cardiovascular. Nuestras mejores

esperanzas para el desarrollo de prevenciones, tratamientos y curas para enfermedades como el Alzheimer, el SIDA y el cáncer incluyen también investigación biomédica utilizando animales.

La transferencia de una enfermedad de un animal a otro se tiene como la forma más confiable de demostrar que una enfermedad es causada por un agente infectivo. Este principio fue demostrado por primera vez en el siglo XIX al inyectar en ratones sangre de vacas infectadas con ántrax. Se demostró que los ratones subsiguientemente desarrollaron la enfermedad(1). Un ejemplo más reciente lo constituyó el aislamiento del virus de la hepatitis C humano usando chimpancés, a los que se les transfirió la enfermedad por transfusión de sangre. Se logró aislar una proteína viral en la sangre del chimpancé que, reaccionando con anticuerpos de pacientes humanos, sirvió como prueba de diagnóstico(2).

Para los defensores de animales es esencial saber cuál es la necesidad de usar modelos animales cuando existen métodos alternativos, tales como los modelos matemáticos de simulaciones de computación y los cultivos celulares. Sin embargo, estos procedimientos pueden servir para reducir el número de animales en experimentación, pero no pueden predecir con fiabilidad el efecto de un producto químico en los sistemas de órganos combinados del cuerpo con toda la complejidad requerida; se utilizan para examinar y determinar el potencial tóxico de una sustancia en fases iniciales de investigación, reduciendo así el número total de animales requerido, pero el examen final debe realizarse en un sistema completo y vivo. La más sofisticada tecnología no puede imitar las complicadas interacciones entre células, tejidos y órganos que se dan en humanos y animales. Los científicos deben entender estas interacciones antes de introducir un

nuevo tratamiento o sustancia en el organismo humano.

La mayoría de las enfermedades son complejas e involucran interacciones dinámicas entre sistemas moleculares y celulares que influyen el desarrollo del proceso de la enfermedad. Además, los estudios de la patogénesis de las enfermedades en animales son una parte del proceso del conocimiento; generalmente, deben ser complementados con estudios clínicos, epidemiológicos e histológicos en humanos.

Los resultados de la investigación con modelos animales proporcionan información necesaria para diseñar pruebas humanas que también deben completarse para la aprobación legal de nuevos dispositivos, fármacos y procedimientos con carácter terapéutico y de diagnóstico. Es necesario conocer cómo un nuevo fármaco o procedimiento afectará a un sistema biológico completo antes de usarlo en humanos. Esto es crítico, tanto por razones científicas como éticas, para no sobrecargar en exceso al ser humano. Un ejemplo es que muchos de los experimentos que se realizan pueden responderse más rápidamente en animales, ya que se usan modelos con un ciclo reproductivo corto.

En efecto, en los códigos de ética para la investigación biomédica los ensayos con animales es una obligación. Según el Código de Nuremberg, cualquier experimento hecho en seres humanos “debe ser diseñado y basado en los resultados de investigación animal”. La Declaración de Helsinki, adoptada en 1964 por la XIII Asamblea Médica Mundial y revisada en cinco ocasiones, cita también que la investigación médica en sujetos humanos “debe estar basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación con animales”.

El desarrollo de una nueva medicina es un proceso largo y complejo. Las pruebas en animales son parte de la información disponible antes de determinar la seguridad y eficacia en humanos. Una vez que un fármaco candidato ha sido seleccionado se realizan estudios de toxicidad para completar la fase preclínica del proceso de desarrollo de un nuevo medicamento(3)¹ y para cumplir con los requisitos de las regulaciones que obligan a demostrar que una medicina potencial posee un nivel aceptable de seguridad y eficacia. Asimismo, se evalúa la toxicología reproductiva en animales cuando se tiene la intención de administrarla en mujeres en edad reproductiva. La práctica general en las pruebas de toxicidad es inducir extratoxicidad en el animal, con el fin de asegurar que la carencia de efectos no sea debida a defectos en la metodología. Debido a esta estrategia el daño a los animales es parte integral de la prueba y se considera inevitable. Generalmente, en las pruebas de toxicidad se les practica eutanasia al final del experimento. Son estos aspectos de la investigación con animales los que causan mayor preocupación ética.

También se usan modelos animales para estudios de biodisponibilidad o sobre el grado o frecuencia con que una medicina o fármaco es absorbido o se hace disponible en el tejido u órgano del cuerpo después de ser administrado(4). Los resultados de pruebas en animales se usan en combinación con datos sobre la eficacia de una medicina potencial para decidir si los efectos beneficiosos del tratamiento superan los riesgos de efectos secundarios adversos y para establecer una dosis segura de uso en ensayos clínicos con seres humanos. Pueden indicar también efectos secundarios potenciales que deben monitorearse cuidadosamente.

1 La fase preclínica incluye el descubrimiento, caracterización, selección y estudios de toxicidad de fármacos candidatos, lo que toma una media de cinco años en realizarse.

Uso de transgénicos como modelos animales de enfermedades humanas

En los últimos años, y debido sobre todo al enorme avance en los conocimientos sobre las bases moleculares de las enfermedades, ha surgido la necesidad de disponer de modelos genéticamente definidos, es decir, en los cuales las mutaciones genéticas que predisponen o participan en el desarrollo de la enfermedad puedan ser controladas(5,6). Esta necesidad, unida al gran avance en tecnología para la manipulación genética en mamíferos, ha conducido al desarrollo de modelos animales modificados genéticamente, en su mayoría de origen murino, que recapitulan muchos de los procesos que tienen lugar en la patología de las enfermedades humanas, permitiendo estudiar y reproducir los síntomas en formas controladas como nunca había sido posible antes(7). Ellos proporcionan una visión más adecuada del proceso de la enfermedad y permiten obtener mejores modelos experimentales para desarrollar y ensayar nuevas terapias.

Los modelos animales transgénicos se usan en la investigación de los mecanismos de patogénesis de enfermedades como dispositivos de ensayo de posibles compuestos terapéuticos para su tratamiento y como dispositivos de validación *in vivo* de tratamientos potenciales. La transferencia de genes recombinantes a estos organismos (transgénesis), dirigidos para que se expresen en ciertos tejidos por medio de promotores específicos, permite generar proteínas recombinantes valiosas para la medicina.

Los organismos transgénicos o genéticamente modificados son aquellos cuyo genoma tiene un gen añadido o alterado en sus células, incluyendo las células germinales. La transferencia de genes se define como la introducción de un fragmento de ADN dentro del genoma huésped con el propósito de que el ADN extraño contribuya

a la síntesis de la proteína en el organismo huésped. Estos animales se fabrican usando una construcción transgénica con la secuencia del gen que se piensa introducir. Con técnicas de ADN recombinante y de micromanipulación o transfección, se introducen en la célula blanco para que se inserte este nuevo gen al azar en el genoma celular. Técnicas de modificación genética, entre otras, son las siguientes: 1) de ADN recombinante que utilizan sistemas de vectores apropiados; 2) técnicas que suponen la incorporación directa en un organismo de material genético preparado fuera del organismo incluidas la microinyección, la macroinyección y la microencapsulación, y 3) de hibridación o fusión celular, incluyendo la fusión de protoplastos.

Para producir animales transgénicos usando microinyección se utilizan, generalmente, virus que se inyectan en huevos no fertilizados con genes recombinantes, integrándolos aleatoriamente a los cromosomas del huésped en regiones no predecibles. La expresión de los genes transferidos (transgenes) depende de la función de los sitios de integración. Normalmente, la transferencia del genoma lleva consigo construcciones de genes combinadas artificialmente con fragmentos de ADN consistentes en secuencias reguladoras de codificación de proteínas. La microinyección y transferencia nuclear del ADN, aplicadas para producir animales transgénicos, implican la inyección de varios miles de copias del ADN en el pronúcleo de un cigoto; los cigotos son transferidos a hembras receptoras y los animales nacidos son examinados para comprobar si los genes inyectados se han incorporado a la cadena de ADN. Aunque este técnica es fiable, es también ineficaz, ya que sólo entre el 1 y el 4% de los cigotos microinyectados son transgénicos.

Recientemente se ha probado en algunos laboratorios un método para transferir genes dirigidos hacia un cierto blanco. Consiste

en introducirlos a las células del tronco embrionario y después inyectarlas a un blastocisto para obtener animales químéricos (en los que sólo algunas células portan el gen transferido). Después se cruzan los animales químéricos y se obtienen ratones transformados con el gen transferido en todas las células.

La generación de transgénicos posibilita la producción de biofarmacias vivas o la construcción de modelos para enfermedades humanas.

Uso de los modelos de ratones transgénicos

Desde hace veinticinco años se ha logrado obtener los primeros ratones transgénicos mediante transferencia génica por inyección directa de ADN exógeno en un cigoto obtenido por fecundación *in vitro*(8,9). A través de uno de los primeros experimentos se obtuvieron ratones transgénicos gigantes, al inyectar en el pronúcleo de un cigoto el gen de la rata que codifica para la hormona del crecimiento. Incluso se obtuvieron también ratones transgénicos gigantes cuando el transgén introducido era el gen humano que codifica para la hormona de crecimiento(10).

El ratón es el modelo animal más usado en la actualidad para el análisis de enfermedades humanas de origen genético, ya que permite un control adecuado de la base genética del organismo y de las posibles alteraciones genéticas que acompañan el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, la importancia de estos modelos es enorme para el estudio *in vivo* de la función de ciertos genes en el desarrollo de la enfermedad, para la identificación de nuevas moléculas diana y para el ensayo preclínico de nuevas terapias dirigidas a estas moléculas. Su estudio es clave para decidir si una determinada estrategia terapéutica es efectiva o supone riesgos secundarios en la salud de los pacientes.

La obtención de modelos genéticamente controlados permite ensayar la efectividad de diseños experimentales específicos contra moléculas dianas en animales vivos, mejorando la efectividad y disminuyendo la toxicidad respecto de las terapias hasta ahora existentes. Asimismo, se puede estudiar la expresión de genes críticos para cambios celulares que ocasionan el desarrollo y progreso de determinadas enfermedades.

Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales incluyen la posibilidad de manipular información genética nueva dentro de la célula y transmitirla a la línea germinal. Por otro lado, el ratón tiene un ciclo reproductivo muy corto con tamaño de camadas grandes; es un animal pequeño, manejable, resistente, bien caracterizado en cuanto a su biología y muy usado en el laboratorio. Es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes. Para el ratón existe un número abundante de anticuerpos y sondas de cADN, y se han construido bibliotecas genómicas y de cADN para cada cepa de ratón. Es relativamente barato en comparación con otros animales experimentales y su mantenimiento, aun en condiciones de alta seguridad, es relativamente sencillo.

El ratón se puede manipular en línea germinal y es posible inactivar genes de modo dirigido para lograr modelos de enfermedades humanas, sobre todo las que afectan al sistema inmune y al desarrollo embrionario, también para el estudio del cáncer y enfermedades tan frecuentes como la diabetes. Actualmente existen unas 1.000 razas de ratones *knock-out* (noqueados). Un ratón *knock-out* es un animal mutante que carece de la expresión específica de un gen, eliminado por mutación dirigida. Se pueden conseguir ratones *knock-out* insertando aleatoriamente un pequeño trozo de ADN en células madre embrionarias. El ADN inactiva la función del gen

donde se inserta y, junto con algunas secuencias adyacentes transcribibles del ratón, suministra un sitio-etiqueta único. Luego se recupera esa etiqueta, de modo que se puede averiguar la identidad del gen inactivado. Por otra parte, en la técnica de células madre embrionarias totipotenciales, necesaria para crear ratones *knock-out*, las únicas células disponibles –hasta muy recientemente– han sido las de ratón. Si se sustituye un gen normal por otro alterado, con mutaciones específicas, el ratón resultante recibe el nombre de “*knock-in*”.

La manipulación de células madre embrionarias ha llevado a la generación de modelos de ratón mutantes que se asemejan en mucho a trastornos humanos. Ratones *knock-out* que carecen de proteínas específicas pueden servir como modelos de enfermedades humanas. Uno de los primeros genes blanco para generar un animal *knock-out* fue el que codifica para el canal del cloro responsable de la fibrosis quística. Estos ratones han sido muy útiles en el estudio de esta enfermedad. Publicaciones recientes indican que los antecedentes genéticos del ratón que lleva el gen mutado influyen en el fenotipo expresado(11).

Los ratones transgénicos sirvieron, en primer lugar, para el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión genética. Esto permitió analizar cómo y por qué un gen específico es activado en algunos tejidos y desactivado en otros. Muchos genes homólogos en los mamíferos son activos en uno o varios tejidos del cuerpo y en ciertas etapas del desarrollo.

Otro de los usos de estos ratones son los estudios toxicológicos: los ratones son modificados genéticamente para incrementar su sensibilidad a alguna enfermedad. Se han producido, por ejemplo, ratones propensos a desarrollar tumores, como el transgénico que expresa el oncogen pim y los deficientes en

p53(12). La detección de eventos tóxicos se mejora introduciendo genes que se activan en presencia de un agente tóxico. Por otro lado, en un ratón pueden introducirse genes humanos que codifican para enzimas o receptores, para “humanizar” una línea de células o tejidos y, por lo tanto, aumentar la predicción de los efectos tóxicos en los humanos. Para estudios de mecanismos de acción, se introducen genes para promover manifestaciones de toxicidad, como los ratones transgénicos que desarrollan neoplasia, denominados “oncoratones”, que han llegado a patentarse(13). En ocasiones, la observación de los cambios en el fenotipo, en ratones modificados genéticamente, puede llevar al descubrimiento inesperado de genes o mecanismos responsables de una enfermedad, con manifestaciones similares en el ser humano. Este fue el caso del gen de la queratina, involucrado en una enfermedad de la piel denominada “epidermolisis bulosa simplex”(14).

Han sido además una herramienta importante para estudiar enfermedades inducidas por el medio ambiente, como el desarrollo del cáncer. La mayor parte de las alteraciones producidas por el medio recaen en mutaciones específicas de tejidos y, finalmente, en la aparición de cáncer. Se sabe que determinados factores ambientales, como ciertos agentes químicos, pueden causar cáncer. Sin embargo, por estudios en modelos experimentales así como por análisis de resultados derivados de seres humanos, se observa un fuerte componente genético de la enfermedad. El componente genético involucra algunos genes que influyen en la susceptibilidad y la progresión del tumor. El proceso es complejo, ya que implica a un número grande de eventos y en ellos hay varios genes involucrados. Esto ha impedido que se conozcan en detalle los mecanismos involucrados en la formación de un tumor.

Como una alternativa, la metodología de los animales transgénicos ha ofrecido la posibilidad de alterar la expresión y la regulación de genes específicos contra un fondo genético constante, abriendo la posibilidad de responder a preguntas sobre el cáncer en el ámbito molecular. Se sabe que una simple mutación genética, por sí sola, no es suficiente para provocar el desarrollo de un tumor, y que se requieren eventos secundarios, tales como la activación o inducción de genes cooperadores, que también juegan un papel esencial en el desarrollo del cáncer. Estas preguntas sólo pueden ser contestadas en el contexto de los animales transgénicos.

Se conocen dos clases de genes que influyen en la formación de un tumor: los supresores de tumor, que actúan en forma negativa para controlar el crecimiento celular, y los oncogenes, que funcionan promoviendo la división celular. Uno de los genes que mejor ha sido estudiado por técnicas transgénicas es el supresor de tumores p53, cuyo producto parece estar involucrado en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Aparentemente, p53 actúa como un guardián del genoma e impide que las células se dividan hasta que haya sido reparado cualquier daño del DNA que esté presente en el genoma(15). En una gran variedad de cánceres humanos las alteraciones genéticas más comúnmente detectadas son mutaciones que inactivan al gen p53 (80% de todos los tumores). Los ratones que portan un transgen mutante, defectuoso de p53, son mucho más susceptibles a la formación de tumores que los animales normales(16).

Por otro lado, también se han hecho estudios con el uso de ratones portadores de algunos oncogenes con secuencias reguladoras que les permiten expresarse en tejidos específicos. Estos ratones han mostrado ser un modelo valioso para estudiar tanto los aspectos genéticos y epigenéticos del desarrollo de neoplasias

como tumores malignos. Se pueden investigar las diferentes fases, desde la transformación hiperproliferativa a la invasiva y metastásico, estudiando mutaciones en genes específicos.

Los ratones trangénicos son también útiles como biosensores, tanto para el estudio de compuestos químicos y drogas que tengan potencial promotor de tumores (carcinógenos) como para moléculas supresoras de tumores. Se han generado ratones que carecen de uno o ambos alelos de genes supresores de tumores (para evaluar la función normal de estos genes *in vivo*), altamente susceptibles al desarrollo de tumores. La iniciación del desarrollo de un tumor gonadal en ratones que carecen de las copias del gen alfa-inhibina demuestra que este ensayo también es útil para identificar nuevos genes supresores de tumor(17).

Han probado ser útiles como modelos animales para realizar estudios de prevención de cáncer y terapia en varios estados de progresión de la enfermedad(18,19). Simulan en muchas formas el inicio y progresión del cáncer en los seres humanos, permitiendo que se realicen observaciones sobre los efectos de agentes quimiopreventivos y terapéuticos en varios estados de desarrollo de la enfermedad.

Los ratones trangénicos y *knock-outs* han servido también para el estudio del sistema inmune y las enfermedades que lo afectan. Entre los resultados obtenidos está el avance en el entendimiento de la tolerancia y la autoinmunidad. Se han desarrollado ratones que sirven como modelo de investigación del lupus eritematoso sistémico y de un gran número de enfermedades autoinmunes: articulaciones periféricas y vertebrales, tracto genital masculino, piel, uñas y corazón. En la actualidad se están desarrollando modelos trangénicos para estudiar la autoinmunidad inducida por productos químicos y biológicos exógenos. Asimismo, se ha estudiado el efecto

que tiene la sobreexpresión o eliminación de los mediadores del sistema inmune, como son las interleucinas y los factores de crecimiento. Esto es particularmente importante para evaluar el efecto que tienen las citocinas en el ser humano y su uso como inmunomoduladores. Los modelos animales proporcionan información sobre la toxicología de estas sustancias, ayudándonos a entender su mecanismo de acción y a regular sus efectos immunotóxicos. Por otro lado, nos permiten evaluar la diferencia entre la administración exógena de estos inmunomoduladores y su producción endógena en animales transgénicos.

También es posible evaluar las diferencias en el plano molecular entre péptidos y proteínas naturales y los producidos biotecnológicamente. En esta área los ratones transgénicos entregan valiosa información acerca de la toxicología e inmunología de la sustancia en cuestión. Otro aspecto importante dentro de la inmunología es la hipersensibilidad tardía o alergias.

Han sido útiles, además, para entender el funcionamiento del sistema nervioso y sus enfermedades. Un ejemplo lo constituyen las investigaciones sobre el gen PrP, que han delineado el campo de la biología del prión, causante de la enfermedad de las vacas locas: un organismo que carece del gen PrP es resistente a la infección por priones(20). También se ha estudiado el papel del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) en los procesos inflamatorios, incluyendo aquellos que tienen lugar en el sistema nervioso central y en enfermedades autoinmunes.

Asimismo, se han estudiado varios modelos de ratones diseñados genéticamente como herramienta para comprender la función de algunas enzimas antioxidantes en los mecanismos de defensa celular contra diferentes tipos de daño por agentes oxidantes.

Uso de animales como modelos para probar vacunas

Generalmente, antes de usarse en humanos, una vacuna se administra a animales y se mide su respuesta inmune extrayendo sangre y tejido(21). Por ejemplo, se prueba la potencia de la vacuna contra el tétano en ratones o cobayas administrando primero una dosis que, se cree, proporcionará protección y después se les inyecta una dosis de la toxina del tétano considerada letal o suficiente para producir parálisis. Si la vacuna tiene la potencia requerida, la toxina no causará efectos adversos en los animales(22); si no los protege, éstos sufren dolor y síntomas relacionados con la enfermedad. En el pasado se requerían muchas más pruebas para evaluación de vacunas en animales que las que se hacen hoy día, en las cuales los animales a menudo sufrían síntomas de la enfermedad e incluso la muerte. A menudo, los animales se eutanizan cuando se ve que desarrollan la enfermedad, por lo que son sacrificados en nombre del progreso científico.

Cuestiones éticas

Una de las características que diferencian al ser humano de otras especies es que es un sujeto ético; es decir, está genéticamente capacitado para prever las consecuencias de sus actos, para hacer juicios de valor y distinguir el bien del mal, eligiendo libremente hacer lo uno o lo otro. Entre las preocupaciones éticas que ha desarrollado el ser humano están el amor a la naturaleza, la defensa medioambiental, la preocupación por la biodiversidad y la bioseguridad. La ciencia nos enseña el valor de la preservación de las especies biológicas y de la integridad de los ecosistemas. Por otra parte, desde el punto de vista bioético, los animales no son, por sí mismos, sujetos de derechos ni de responsabilidades, pero las personas sí tenemos responsabilidades hacia ellos: los animales no son sujetos morales pero sí objetos morales.

Sin embargo, desde otra perspectiva, los animales poseen ciertas características que los acercan a ser considerados también como sujetos morales. Existe una línea continua en la adquisición de características que hace difícil una división estricta y exacta. Se aducen los siguientes rasgos con potencial de sustrato moral: son seres sensibles, con capacidades cognitivas, capacidad para mejorar, sociabilidad y posesión de una vida(23). No obstante, filósofos como Malebranche y Descartes establecieron una concepción dualista de la mente y el cuerpo que sólo se aplica a los seres humanos, argumentando que los animales carecen de capacidades cognitivas relevantes.

Aun admitiendo que los animales no tuvieran capacidad moral, tampoco queda justificado el ejercer crueldad sobre ellos. Por carecer de autonomía, los animales no pueden negarse a ser objeto de experimentos y, por tanto, la responsabilidad de no ocasionar daños innecesarios recae en el ser humano: no se justifica infiligr dolor y sufrimiento ilimitado a animales de investigación, tengan más o menos capacidades moralmente relevantes.

Hay posturas contrapuestas. Peter Singer(24) piensa que se debería otorgar a los animales igual consideración que a los seres humanos en cuestiones de sufrimiento. Peter Carruthers(25), en cambio, se manifiesta en contra.

Respecto de la investigación con animales existen varias posiciones, ya sea para justificarla o para rechazarla(23, pp. 239-255). Bajo una posición, se la justifica por el beneficio que supone para el ser humano, ya que éste tiene preferencia por razones evolutivas, filosóficas o religiosas. Bajo otro punto de vista se considera que toda investigación con animales supone un dilema moral: mientras el uso de animales es necesario para ajustarse al imperativo de curar y prevenir enfermedades, también implica que a éstos se les trata en formas que son moralmente

equivocadas, por lo que buscar formas de reemplazar y reducir el número de animales y disminuir su sufrimiento se constituye en una prioridad(26).

Otro punto de vista es el abolicionista, que considera que cualquier investigación que cause dolor, sufrimiento y angustia es equivocada y no hay justificación moral en realizar investigación dañina sobre animales con capacidades cognitivas si no es para su propio beneficio.

Hay que considerar que la investigación animal ayuda también a otros animales. Por ejemplo, las vacunas para el parvovirus en perros y leucemia felina en gatos fueron posibles gracias a la prueba animal. La investigación con animales también ha proporcionado métodos para rescatar especies en peligro de extinción

Modelos animales y sufrimiento

¿En qué medida se justifica el sufrimiento de animales para beneficio del ser humano? Para defender el uso de animales experimentales los científicos se basan en los espléndidos logros de la medicina preventiva, la erradicación de muchas enfermedades infecciosas y el control o disminución de la peligrosidad de otras. Bajo esta premisa, se asume que el valor de la vida de los animales de laboratorio no es absoluto y que es aceptable sacrificarlos por el avance del conocimiento. Existen posturas en contra de todo tipo de experimentación en animales, pero no parece lógico que toda la carga de experimentación en sistemas vivos se la lleve el ser humano. Es por evitar daños irreversibles en seres humanos que se experimenta primero en animales.

Un dilema ético lo constituye la propia investigación sobre el dolor, pues requiere conductas “antiéticas” sin las cuales no se avanzaría en su manejo para los seres humanos. No se hubieran logrado avances en el

conocimiento de los mecanismos, evaluación, métodos y modalidades del control del dolor, como tampoco en la anatomía, morfología, fisiología y bioquímica de los nociceptores y proyecciones sinápticas, entre otros(27). Este tipo de investigación implica trabajar con animales de experimentación sin analgesia. El dolor, aunque indeseable, representa una estrategia adaptativa que protege de las agresiones del medio externo; sin la presencia de las respuestas reflejas ante un estímulo doloroso se estaría en desventaja para la supervivencia, por lo que está presente en todo el reino animal.

Debido a que el dolor es un estado de conciencia y, como tal, nunca puede ser observado, se hace difícil definirlo en animales. Una definición general del dolor reza: “Una experiencia sensorial aversiva causada por un daño que provoca una reacción motora y vegetativa para evitarlo”(27).

Aunque no se ha podido esclarecer si la percepción consciente del dolor está presente en otros organismos, en ellos también se manifiestan casi todas las señales externas que ayudan a deducirlo para el ser humano, tales como cambios de conducta, contorsiones, quejas, intentos por evitar la fuente de daño e, incluso, trastornos fisiológicos como elevación inicial de la presión en la sangre, pupilas dilatadas, transpiración, pulso agitado y, si el estímulo continúa, caída de la presión sanguínea (27).

Conforme un organismo es más evolucionado, son más complejos sus mecanismos para salvaguardar la integridad, así como el desarrollo de la experiencia dolorosa y la expresión del comportamiento relacionado con ella, lo que implica necesariamente el desarrollo del sistema nervioso. Todo parece indicar que los vertebrados no divergieron hasta que el Sistema Nervioso Central (SNC) ya se había

formado y que en las distintas especies éste responde de manera semejante ante las mismas circunstancias en las que se sentiría dolor. Los impulsos que generan el dolor están localizados en el diencéfalo, que está muy desarrollado en mamíferos y aves(28). No hay, por tanto, razones científicas para negar que los animales sientan el dolor, aunque es posible que no interpreten la sensación de la misma manera que el ser humano, ya que éste reflexiona y es sujeto de emociones.

Se cuestiona la extrapolación de los datos obtenidos en animales, ya que no reflejan la fisiopatología del dolor de la misma manera(27). En efecto, no es suficiente la validación de la extrapolación de datos a pacientes con dolor, especialmente en síndromes de dolor crónico; se necesitan, igualmente, estudios con seres humanos. El investigador que trabaja con animales debe asegurarse de que sean expuestos sólo a los estímulos o prácticas necesarias para contestar la pregunta de investigación y tomar en cuenta los principios bioéticos estipulados en las diferentes guías del dolor para el empleo de animales en la investigación(27,29,30).

Aspectos éticos de la manipulación genética

Existe preocupación por las posibles consecuencias de introducir, eliminar o modificar genes para obtener organismos genéticamente modificados. Se argumenta que la modificación genética de animales interfiere en su historia natural y que el ser humano no tiene derecho a tal injerencia. Sin embargo, la mayor parte de los científicos considera que no existe diferencia esencial, en principio, entre las formas tradicionales de selección genética practicada por siglos y las modificaciones genéticas(31); muchas de ellas podrían, teóricamente, haberse producido por medio del apareamiento selectivo. La única diferencia

es que la modificación mediante ingeniería genética es más rápida y más precisa.

Desde el punto de vista bioético, la situación creada por la obtención de animales transgénicos portadores de genes humanos para la obtención de proteínas terapéuticas humanas no es esencialmente nueva, ya que desde los primeros tiempos de la ingeniería genética molecular se han introducido genes humanos en células bacterianas para obtener proteínas humanas (insulina, hormona de crecimiento, interferón, etc.). Tanto en el caso de las bacterias como en el de los animales transgénicos –que se convierten en factorías naturales (biorreactores) de proteínas humanas–, la valoración ética es positiva, ya que, en general, no se afecta ni la salud ni el bienestar del animal. Al quedar restringida la expresión del gen humano a un órgano particular, su fisiología y desarrollo no se ven alterados y, por tanto, se evita cualquier daño a éste.

Sin embargo, interferir deliberadamente en el genotipo de los animales produciendo organismos genéticamente modificados puede amplificar las formas en que puede causarse daño. Por ejemplo, la introducción de un gen podría llevar a repercusiones inesperadas e impredecibles para el bienestar de los animales a las que se podría reaccionar tarde: se incrementaría la mortalidad fetal y el desperdicio de animales creados sin posible uso, caso que se da muy a menudo en la experimentación con mutágenos(23, pp. 45-46). Esta posibilidad demanda el requisito ético de diseñar experimentos de modificación genética con la precaución de no causar daños innecesarios.

Aunque, en principio, muchos organismos genéticamente modificados son fenotípicamente normales en apariencia y no experimentan mayores problemas, hay informes de que al

menos un 10% experimenta consecuencias dañinas. Un informe sobre ratones genéticamente modificados en laboratorios de Dinamarca encontró que el 21% de las cepas de ratón creadas experimentaban molestias menores, otro 15% molestias mayores y un 30% incremento en la mortalidad y susceptibilidad a enfermedades(32,33).

Algunas veces se crean animales con anormalidades severas. Por ejemplo, un ratón en que se silenció un gen receptor del factor de crecimiento nació con defectos en el esqueleto y sordera profunda(34). Generalmente se necesita un gran número de animales para producir una cepa de ratones genéticamente modificada, debido a la baja eficiencia del método; la mayoría de los animales producidos no tiene la modificación genética deseada y a éstos, habitualmente, se les practica eutanasia.

El problema ético de la eutanasia

Muchos de los animales en estudio deben ser “eutanizados”, con el fin de obtener tejidos para una evaluación patológica y para su uso en pruebas *in vitro*. Los animales utilizados en experimentos de los que no se requieren tejidos para una evaluación patológica podrían tomar parte en experimentos adicionales; sin embargo, excepto en raras circunstancias, las regulaciones no permiten que un animal sea usado en más de un gran procedimiento quirúrgico y en esos casos se recurre a la eutanasia. Aunque se busquen métodos que no causen dolor, participar en experimentos supone para el animal su muerte segura.

Problema ético de la extrapolación de resultados

Dentro del cuestionamiento ético a la experimentación con animales está el hecho de que los resultados no se pueden extrapolar del todo a la salud humana y se requiere que,

de todos modos, se realice investigación en seres humanos. Un ejemplo de los peligros de extrapolación fue lo que ocurrió con la Talidomida en los años 60 y 70. Esta droga apareció en el mercado al final de los años 50 en Alemania, después de ensayos realizados en miles de animales para comprobar su seguridad. Fue vendida como un sedante para las mujeres embarazadas o lactantes y, a pesar de las pruebas de seguridad, por lo menos 10.000 niños de madres que la consumieron nacieron con deformidades severas. El Clioquinol fue una droga fabricada en los años 70 y vendida como un remedio seguro para la diarrea. No sólo no funcionó contra la diarrea, como se prometió a los pacientes, sino que, de hecho, acentuó los síntomas. A causa de la dispensa del Clioquinol al público, 30.000 personas quedaron ciegas y/o paralíticas y miles más murieron.

Muchas enfermedades estudiadas en animales ni siquiera son jamás desarrolladas por ellos, como el SIDA, la artritis, la esclerosis múltiple o la arteriosclerosis: son “imitadas” causándoles dolencias semejantes (como espasmos por electroshock para imitar la epilepsia) y obteniendo respuestas distintas a las de los seres humanos. Algunas enfermedades (coronarias, cáncer), resultado de determinados estilos de vida durante décadas, se intentan reproducir en animales en sólo semanas o meses.

El confinamiento en laboratorios distorsiona la respuesta natural de los animales: el estrés sufrido por los animales enjaulados tiene una gran influencia en el surgimiento de enfermedades, favoreciendo el desarrollo de tumores y alterando el ritmo cardíaco y respiratorio. El ejercicio físico que se les permite es mínimo, debido a lo reducido de sus jaulas, lo que puede dificultar la expulsión de sustancias tóxicas y el correcto desarrollo corporal.

Una enorme cantidad de efectos secundarios producidos por medicamentos no son detectados en los animales, por ejemplo el dolor de estómago, malestar general, jaqueca, náusea, visión borrosa, zumbido en los oídos, etc.

No obstante, aunque es imposible extrapolar directamente datos animales a los seres humanos, también existe amplia evidencia de los beneficios que ha traído la experimentación en animales para la biomedicina. El ser humano se halla en continuidad evolutiva con el resto de los organismos. Existen suficientes similitudes de comportamiento, anatómicas, fisiológicas, neurológicas, bioquímicas y farmacológicas como para que los animales sean modelos útiles en el estudio de efectos biológicos del desarrollo de enfermedades, efectos terapéuticos y otras intervenciones. Se ha probado ampliamente que la investigación en animales genéticamente normales y modificados es relevante para el ser humano, en combinación con otros métodos como cultivos celulares y estudios clínicos, de forma que no se puede sostener que toda la experimentación animal es defectuosa.

Evaluación ética

Debido a las voces que se han alzado en contra del sufrimiento innecesario de animales en experimentación, se ha llevado a la agenda, en comunidades locales o en el plano internacional, el análisis de los riesgos y ventajas de la investigación científica. Esta actitud es constructiva y contribuye a mejorar el conocimiento de la sociedad sobre las virtudes de la investigación científica y a reducir los riesgos de su aplicación. Con ello se han logrado grandes avances. En el caso de las vivisecciones, la actual legislación en muchos países exige buenos tratos a los animales destinados a la experimentación. Se ha logrado además, reducir las prácticas de vivisección a sólo lo absolutamente necesario, minimizando el sufrimiento de los animales. En EE.UU. la

Academia Nacional de Ciencias y los Institutos Nacionales de Salud han emitido normas especiales para la investigación, que imponen a todos los investigadores biomédicos la obligación de demostrar que sus instituciones de trabajo cuentan con las instalaciones adecuadas para el bienestar de los animales. Además, su uso en la investigación está estrictamente controlado y regulado por las leyes federales, incluyendo el Acta del Bienestar de los Animales, que regula la eliminación y reducción del dolor así como otros aspectos del cuidado, tales como habitáculo, alimentación, ejercicio y bienestar psicológico. Estas normas y prácticas son comunes en el ámbito internacional; sin embargo, la experimentación con animales no está legislada ni regularizada en muchos países de Latinoamérica.

Hay quienes opinan que se está exagerando en las atenciones a animales experimentales y que se desvían recursos muy necesarios para otras finalidades. Sin embargo, este parece ser el mejor camino y se reconoce que, al asegurar su bienestar, se obtienen resultados más fiables y disminuye el número de experimentos que es necesario realizar.

Para garantizar el mejor tratamiento posible cada institución que utiliza animales debería establecer un Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)(35), que supervise, examine y vigile cada posible experimento. Estos comités deberían incluir a miembros de la comunidad científica, un bioeticista, un miembro lego y un veterinario.

Algunos de los aspectos más importantes para cualquier proyecto que involucre la utilización de modelos animales serían(36):

1. *Instrucción y capacitación del personal profesional y técnico:* el personal debe saber que:

- (a) los cuidados que rodean al animal influyen en forma directa sobre el resultado de los experimentos;
 - (b) el estado de bienestar de los animales está íntimamente ligado a su capacidad de respuesta. De esta última inquietud nació el uso de animales libres de patógenos específicos y de gérmenes como condición para obtener resultados experimentales confiables y reproducibles.
2. *En las condiciones de alojamiento son importantes:*
- (a) la cantidad de animales por caja. Existe actualmente una tendencia a aumentar el espacio por animal e, inclusive, a estimular sus actividades por medio de ruedas u otros accesorios;
 - (b) las constantes ambientales controladas. Las temperaturas extremas, la falta de renovación del aire, las altas concentraciones de amoníaco, etc., someten a los animales a sufrimientos innecesarios e invalidan los resultados desde el punto de vista experimental. Ellos tienen necesidades fisiológicas y de comportamiento que deben ser identificadas y proporcionadas para cada especie.
3. *Buenas prácticas de sujeción, inyección, analgesia, anestesia y eutanasia:* el animal

de laboratorio es un ser vivo y, por tanto, sensible a cualquier procedimiento capaz de causar dolor en el hombre.

Conclusiones

El cuidado de los animales deberá tener un capítulo importante en la bioética futura. Si bien algunos aspectos de la investigación biomédica están dependiendo menos del animal entero y buena parte del trabajo se hace ahora en preparaciones aisladas, aún es inevitable la etapa de experimentación animal, reducida en sus dimensiones, enriquecida por cuidados especiales, pero necesaria al fin.

De la misma manera, no se puede evitar la prueba final en el propio ser humano, con todas las precauciones y el respeto que nos merecen nuestros semejantes, ya que la investigación clínica en voluntarios informados sigue siendo indispensable antes de poner a disposición de la sociedad cualquiera nueva oferta de progreso en medicina.

En la situación actual, lo más razonable es adoptar la postura intermedia de considerar el uso de animales en investigación como necesario para ajustarse al imperativo moral de curar y prevenir enfermedades humanas, pero buscando formas de reemplazar y reducir su número y disminuir su sufrimiento.

Referencias

1. Koch R. *Biography*. [Sitio en Internet] Disponible en <http://nobelprize.org/medicine/laureates/1905/koch-bio.html>. Acceso en mayo de 2006.
2. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New England Journal of Medicine* 1989; 321: 1494-1500.
3. Network Science. *The process of Drug Development*, 2004. [Sitio en Internet] Disponible en http://www.netsci.org/scgi-bin/Courseware/projector.pl?Course_num=course1&Filename=top.html. Acceso en mayo de 2006.

4. MacGregor JT. The future of regulatory toxicology: impact of the biotechnology revolution. *Toxicology Science* 2003; 75: 236-248.
5. Clarke AR. Manipulating the germline: its impact on the study of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 435-441.
6. Santos de Dios E. The use of animal models in cancer research. *Revista Oncología* 2002; 4: 55-57.
7. Van Dyke T, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 2002; 108: 135-144.
8. Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmissions of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981; 214: 1244-1246.
9. Palmiter RD, Brimster RL, Hammer RE, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982; 300: 611-615.
10. Palmiter RD, Norstedt G, Gelinas RE, et al. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 1983; 222: 809-814.
11. Haston CK, Corey M, Tsui LC. Mapping of genetic factors influencing the weight of cystic fibrosis knockout mice. *Mammalian Genome* 2002; 13: 614-618.
12. Berns A, Van der Lugt N, Van Lohuizen M, et al. Mouse model systems to study multistep tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology* 1994; 59: 435-447.
13. Knowles LP. Of mice and men: patenting the oncomouse. *Hastings Center Report* 2003; 33: 6-7.
14. Cao T, Longley MA, Wang XJ, Roop DR. An inducible mouse model for epidermolysis bullosa simplex: implications for gene therapy. *Journal of Cell Biology* 2004; 152: 651-656.
15. Giono LE, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *Journal of Cell Physiology* 2006; 209: 13-20.
16. Hoogervorst EM, Van Steeg H, De Vries A. Nucleotide excision repair- and p53-deficient mouse models in cancer research. *Mutation Research* 2005; 574: 3-21.
17. Burns KH, Agno JE, Sicinski P, Matzuk MM. Cyclin D2 and p27 are tissue-specific regulators of tumorigenesis in inhibin alpha knockout mice. *Molecular Endocrinology* 2003; 17: 2053-2069.
18. Thyagarajan T, Totey S, Danton MJ, Kulkarni AB. Genetically altered mouse models: the good, the bad and the ugly. *Critical Review Oral Biology Medicine* 2003; 14: 154-174.
19. Weiss B, Shannon K. Mouse cancer models as a platform for performing preclinical therapeutic trials. *Current Opinion Genetic Development* 2003; 13: 84-89.
20. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993; 73: 1339-1347.
21. Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, De Leeuw WA. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. *ECVAM Workshop Report* 1999; 35 ATLA 27:79-102.
22. Weisser K, Hechler U. *Animal Welfare Aspects in the Quality Control of Immunobiologics: A critical*

evaluation of animal tests in pharmacopoeial monographs. Nottingham: FRAME, ECVAM and the Paul Ehrlich Institute; 1997.

23. Nuffield Council on Bioethics. *The Ethics of Research Involving Animals.* Latimer Trend & Company Ltd; 2005: 38-52.
24. Singer P. *Animal Research II. Philosophical Issues.* New York, NY: Simon and Schuster Macmillan; 1995.
25. Carruthers P, Smith PK. *Theories of Mind.* Cambridge: Cambridge University Press; 1996.
26. Rusell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique.* London: Methuen; 1959.
27. Short ChE, Van Poznak A. *Animal Pain.* New York, London, Melbourne, Tokyo: Ed. Churchill Livingstone; 1992.
28. León-Olea M. Evolución filogenética del dolor. *Elementos* 1997; 36: 9: 19-23.
29. Mukerjee M, Writer S. Trends in Animal Research. Increased concern for animals, among scientists as well as the public, is changing the ways in which animals are used for research and safety testing. *Scientific American* 1997; Feb: 70-77;
30. American Psychological Association. *Guidelines for Ethical Conduct in the Care Use of Animals.* Developed by the American Psychological Association Committee on Animal Research and Ethics (CARE).
31. Royal Society. *The Use of genetically modified animals.* London: The Royal Society; 2001.
32. BVAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. Sixth Report: Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Laboratory Animals* 2003; 37: 3, Supplement S1-49;
33. Thon R, Lassen J, Kornerup Hansen A, et al. Welfare evaluation of genetically modified mice - An inventory study of reports to the Danish Animal Experiments Inspectorate. *Scandinavian Journal Laboratory Animals Science* 2002; 29.
34. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, et al. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genetics* 1996;12: 390-397.
35. CCAC. *Canadian Council on Animal Care*, 2000. [Sitio en Internet] Disponible en: <http://www.ccac.ca> Acceso en abril de 2007.
36. Goldberg A, Zurlo J, Rudacille D. The Three Rs and Biomedical Research. *Science* 1996; 272: 1403.

Recibido el 12 de enero de 2007.
Aceptado el 23 de marzo de 2007.