

Estrategias de identificación de planteamientos alternativos a la experimentación animal

Repetto G¹, Álvarez Herrera C¹, del Peso A²

¹Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla. Coordinador Sección de Métodos Alternativos de AETOX; Presidente de REMA. ²Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla.

Recibido 7 octubre 2014 / Aceptado 6 noviembre 2014

Resumen: Los investigadores deben asegurarse de que la información que podrían obtener con su experimentación 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 consideraciones de protección animal. Sin embargo, la identificación de procedimientos alternativos empleados por otros científicos sigue siendo un proceso muy complejo, debido, sobre todo, a la deficiente indexación de las publicaciones en las bases de datos bibliográficas. Una búsqueda eficiente debe basarse en emplear siempre varias bases de datos, en revisar al menos los documentos de los últimos 5-10 años. En primer lugar debe evitarse la duplicación inútil de investigaciones, es decir, asegurarse de que la información que pudiera obtenerse en el estudio no está ya disponible. A continuación se realiza la búsqueda de posibles alternativas de reemplazo. Si ésta no fuera productiva, se identificarían alternativas de reducción y refinamiento, tratando de mejorar, en lo posible, cada una de las fases de la experimentación animal. Los estudios toxicológicos de finalidad reguladora presentan la exigencia de utilizar protocolos oficiales, por lo que deben localizarse en sus directorios específicos. Las alternativas en la enseñanza y entrenamiento, como los modelos mecánicos, audiovisuales y de simulación, se encuentran recogidas en bases de datos específicas. Finalmente, cuando no se encuentran opciones válidas en otras fuentes, es posible recurrir a expertos, tanto directamente como en foros especializados. Todo ello se facilita con el buscador Buscaalternativas.com (<http://buscaalternativas.com>).

Palabras clave: Alternativas, experimentación animal, reducción, refinamiento, reemplazo

Abstract: Strategies for the identification of alternative approaches to animal experimentation. The researchers should be sure that the information obtainable with the experiments is not yet available, that there is no other possible procedure without the use of animals or that the protocol was designed taking into account animal protection considerations. However, the identification of alternative procedures employed by other scientists is a very complex process, mainly due to the deficient indexation of the articles. An efficient search must be based on the use of several data bases and the review of documents of the last 5-10 years. The search strategy presents several phases. Firstable, the unnecessary duplication of studies should be avoided, assuring the information obtainable in the study is not yet available. A search for replacement alternatives is then carried out. If it is not productive, reduction and refinement alternatives are identified to improve every phase of animal research. Toxicological regulatory studies must use official protocols, which should be localized in specific directories. Alternatives in education and

training, including mechanical models, audiovisuals and simulations are included in specific databases. Finally, when no valid options are found in other sources, it is possible to ask experts, directly or through specialized debate lists. The procedure is facilitated thanks to the Web Buscaalternativas.com (<http://buscaalternativas.com>).

Key words: Alternatives, animal experimentation, reduction, refinement, replacement

Introducción

La investigación se encuentra hoy día encauzada no sólo por razones éticas, logísticas, económicas y científicas, sino también por requerimientos legales. En el ámbito europeo debe destacarse la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos [1], que se traslada a la legislación española por el Real Decreto 53/2013 [1-2]. Esto implica que los investigadores han de mostrar la necesidad real de utilizar animales en las aplicaciones científicas y de enseñanza. Estas normativas pretenden asegurar la protección animal y, en particular, que se dispensen los cuidados adecuados a los animales utilizados; que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o lesión prolongados; que se evite toda duplicación inútil de procedimientos y que se reduzca al mínimo el número de animales utilizados en los procedimientos, aplicando en lo posible métodos alternativos.

De acuerdo con las citadas normativas, que adoptaron el "Principio de las tres erres" enunciado por Russell y Burch [3], el investigador debiera justificar, entre otros: la aplicación de métodos para reemplazar, reducir y refinar el uso de animales; el uso de anestésicos, analgésicos y otros medios para aliviar el dolor; las medidas para reducir, evitar y aliviar cualquier forma de sufrimiento de los animales a lo largo de toda su vida; el uso de puntos finales humanitarios; la estrategia experimental o de observación y modelo estadístico para reducir al mínimo el número de animales utilizados, el dolor, sufrimiento, angustia y el impacto ambiental, cuando proceda; la reutilización de animales y su efecto acumulativo sobre el animal; la propuesta de clasificación de los procedimientos en función de su severidad; las medidas para evitar la repetición injustificada de procedimientos; las condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales; los métodos de eutanasia; y la capacitación de las personas que participan en el proyecto [1,2].

Sin duda alguna la promoción de los *planteamientos alternativos* es uno de los aspectos básicos que impregnan la nueva normativa de protección animal. Esta es la terminología empleada en la Directiva 2010/63/UE, en concreto "alternative approaches" en inglés, y consecuentemente en el Real Decreto 53/2013 [1,2]. La

* e-mail: grepkuh@upo.es

denominación de planteamientos alternativos es muy acertada, ya que trasmite que es necesaria una actitud abierta a nuevas opciones, más que la simple sustitución de unos procedimientos por otros. Además debe tenerse en cuenta que se ha ampliado el ámbito de aplicación para proteger también, por ejemplo, a los animales de los que se extraen tejidos para utilizarse en estudios *in vitro*. En la práctica [4], las opciones alternativas disponibles son fundamentalmente las incluidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales planteamientos alternativos

| |
|--|
| 1. Evitar experimentos innecesarios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ; Protocolos normalizados. Disponibilidad de estudios previos, intercambio de información. Flexibilidad. Estrategias inteligentes. Modelos en la enseñanza. |
| 2. Modelos Computarizados (<i>in silico</i>) de Predicción e integración de datos |
| 3. Organismos inferiores: Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, invertebrados |
| 4. Embriones en las etapas iniciales: peces, anfibios, reptiles, pájaros, mamíferos |
| 5. Métodos <i>In vitro</i> : Órganos, Cultivos, Sistemas acelulares |
| 6. Estudios animales: Reducción: número de animales usados. Refinamiento: minimización del dolor y distress; nuevos modelos |
| 7. Estudios en humanos |

Son *planteamientos alternativos* aquellas técnicas que puedan aportar un nivel de información igual o superior al obtenido en procedimientos con animales, pero que no utilicen o utilicen menos animales o impliquen procedimientos menos dolorosos [2]. Por lo tanto, como métodos alternativos se incluyen a aquellas técnicas o estrategias experimentales que pretenden 1º el *Reemplazo* del empleo de animales; 2º la *Reducción*, es decir, la aplicación de estrategias encaminadas a utilizar el mínimo número de animales necesario para alcanzar el objetivo propuesto; 3º el *Refinamiento*, que incluye la mejora de aquellos procedimientos que afectan a la vida del animal de experimentación y permiten aliviar o reducir el posible dolor o malestar.

El objetivo del presente trabajo es facilitar los estudios experimentales teniendo en cuenta la adecuada aplicación de los planteamientos alternativos, para lo cual se desarrolló e incluyó en 2005 en Internet Buscaalternativas.com, un sitio en español sobre alternativas en / y a la experimentación animal (<http://buscaalternativas.com>), del que se ofrece una imagen en la figura 1.

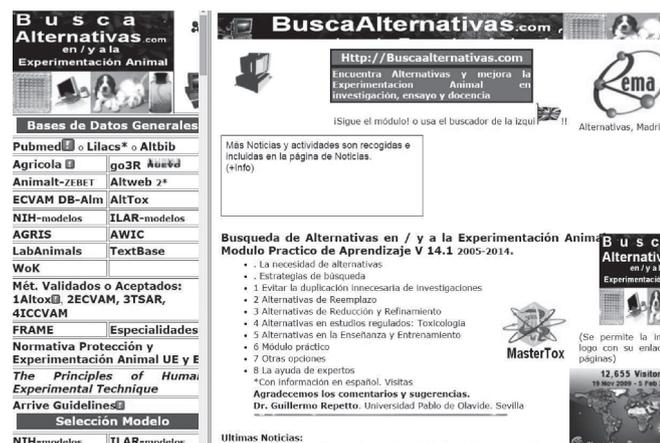


Figura 1. Imagen del buscador de alternativas disponible en Internet Buscaalternativas.com (<http://buscaalternativas.com>)

La estrategia experimental

En cualquier proyecto experimental debiera realizarse una *planificación estratégica inicial* definiendo claramente los objetivos, elaborando las hipótesis a demostrar y especificando los análisis diana, incluyendo la determinación del conjunto de datos e

información que serán necesarios [5-7]. En todo este proceso existen una serie de herramientas que pueden ser útiles y que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales herramientas de ayuda sobre planteamientos alternativos

- Diagrama de Planificación Estratégica para Reducir el Uso de Animales en Ciencia Biomédica. FRAME. http://www.remanet.net/FAQ/documentos/strategic_planning_posterspanish.pdf
- Buscaalternativas.com encuentra alternativas de reducción, refinamiento y reemplazo <http://buscaalternativas.com/>
- Guía ECVAM de buena práctica de búsqueda de alternativas a los animales <http://bookshop.europa.eu/en/the-eurl-ecvam-search-guide-pbl.BN124391/>
- Curso de Diseño experimental de MFW Festing. <http://www.3rs-reduction.co.uk/>
- 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>
- 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>
- REMA- Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos <http://www.remanet.net/>

Se continúa con la *revisión de antecedentes*, evaluando críticamente la bibliografía para establecer el marco conceptual de referencia [8-13]. Se pretende conocer el estado de conocimiento hasta en ese momento, lo que se denomina como “el estado del arte”, que incluye lo que ya se ha investigado y sus resultados, cuando se hizo, cuales son los equipos que han destacado en ese tema, sintetizar la información, buscar indicaciones para nuevas hipótesis, buscar fundamento para ellas y conocer la metodología empleada y las razones de ello. Finalmente se extraen argumentos que apoyen la necesidad del estudio, y estimen la probabilidad de éxito y su relevancia.

Con esta información se procede a la definición del problema, centrando el campo de interés, la elaboración de la hipótesis que conteste a las preguntas realizadas y la redacción del proyecto y del plan de trabajo.

La *planificación del programa* implica además clasificar los métodos viables según el impacto en los animales, desde la no utilización de animales hasta el uso de animales con sufrimiento severo. Planear una secuencia de experimentos que ofrezca resultados satisfactorios con el menor uso animal y con la menor severidad. La figura 2 refleja la forma en que pueden organizarse las distintas etapas para alcanzar la meta con mayores posibilidades de éxito [5].

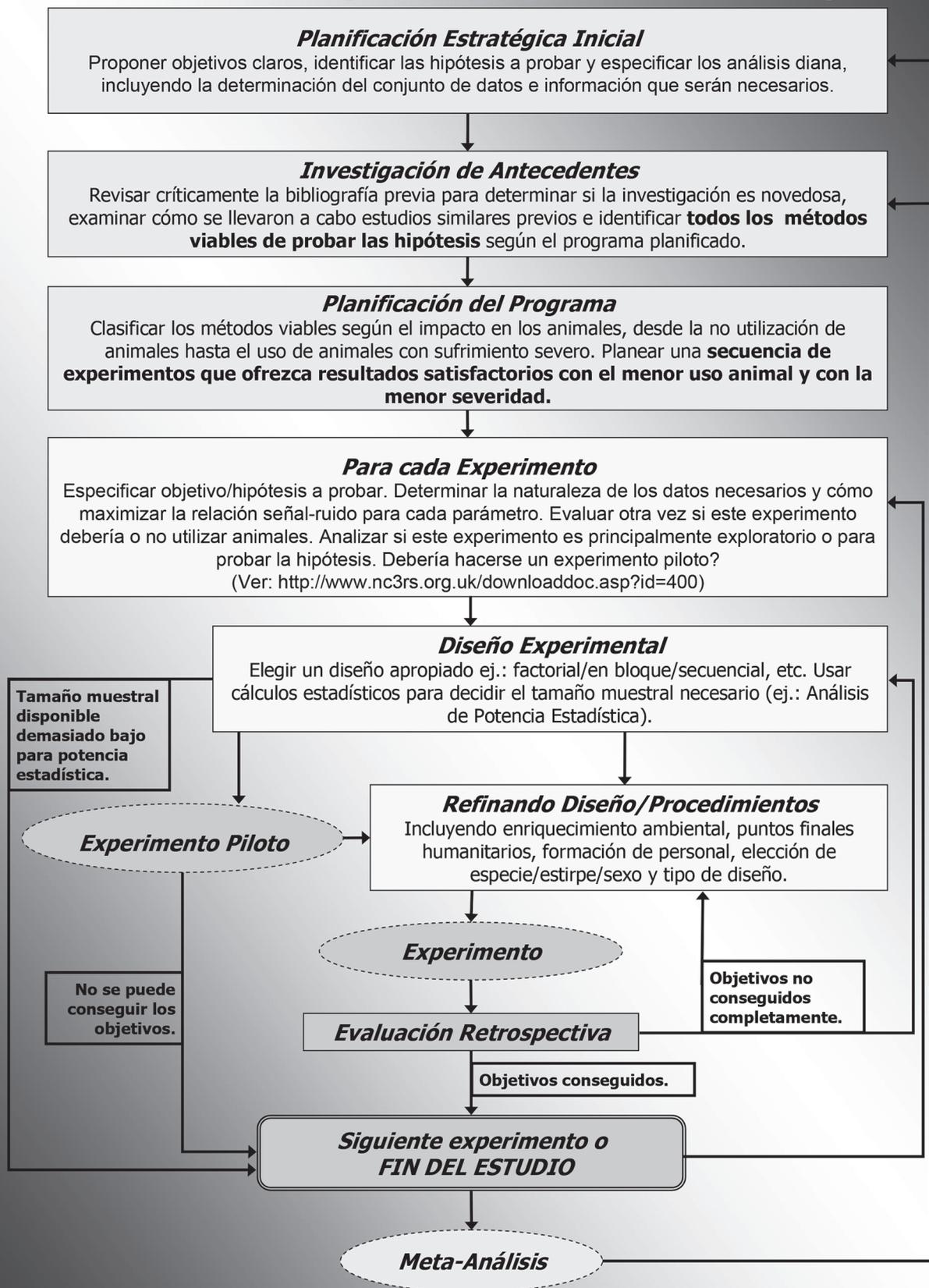
Para cada experimento se debiera especificar el objetivo/hipótesis a probar. Determinar la naturaleza de los datos necesarios y cómo maximizar la relación señal-ruido para cada parámetro. Evaluar otra vez si este experimento debería o no utilizar animales. Analizar si el experimento pretende probar la hipótesis o si es un experimento piloto de finalidad exploratoria, que son muy recomendables al iniciar líneas de trabajo.

A continuación debiera realizarse el diseño experimental, eligiendo un tipo apropiado ej.: factorial/en bloque/secuencial, etc. Usar cálculos estadísticos para decidir el tamaño muestral adecuado (ej.: Análisis de la potencia estadística). Todo ello facilita el refinado del diseño, en el que se incluyen aspectos de enriquecimiento ambiental, puntos finales humanitarios, formación de personal, elección de especie/estirpe/sexo y tipo de diseño.

Evitar la duplicación innecesaria de investigaciones

Aunque parezca obvio, debe recordarse que en primer lugar el investigador debe asegurarse de que la información que pudiera obtener en el estudio no ha sido ya conseguida, lo que haría innecesario realizar el experimento. Para ello deben consultarse varias *bases de datos bibliográficas generales* (PubMed, Agrícola,

Planificación Estratégica de Programas de Investigación



Para solicitud de copias email: michelle@frame.org.uk

Referencia : Gaines Das, Fry, Preziosi and Hudson, *ATLA* 37, 27-32, 2009

Figura 2. Planificación estratégica de programas de investigación [5]

etc) y bases de datos específicas de la especialidad considerada. Además de Pubmed debieran usarse, siempre que sea posible, Embase y Biosis. Se ha de insistir en la necesidad de usar varias bases de datos ya que la coincidencia de documentos recuperados en la misma búsqueda en las tres principales bases de datos biomédicas (PubMed, Embase y Biosis) es menor al 30% [10]. Ello implica que, si se desea conseguir una revisión exhaustiva, no es en absoluto suficiente realizar búsquedas de información en una sola de ellas.

Si se encuentran estudios que utilicen metodologías similares a las que se pretende emplear, es conveniente anotar las palabras clave que los describen por si fueran útiles posteriormente.

PubMed es un servicio gratuito de la Biblioteca Nacional de Medicina Norteamericana que incluye más de 24 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 textos completos, una parte de ellos gratuitos a través de PubMed Central.

Agricola es la base de datos bibliográfica gratuita AGRICultural OnLine Access. Fue creada por la Biblioteca Nacional de Agricultura Norteamericana e incluye citas de literatura sobre agricultura, veterinaria, entomología, plantas, acuicultura, pesca, ganadería, alimentos, nutrición y ciencias medioambientales. Enlaza con fuentes de textos completos. Contiene referencias de libros publicados desde 1970 y artículos de revistas desde 1982. Es mucho más amplia que Medline, al incluir otras bases de datos en la ciencia del animal de laboratorio, manejo y alojamiento.

Embase ofrece cobertura de la literatura biomédica, con más de 28 millones de registros de más de 8400 revistas publicadas actualmente. Embase incluye más de 6 millones de discos y más de 2700 revistas que no están cubiertos por Medline.

Biosis, accesible desde la Web of Knowledge, es una fuente para investigaciones sobre ciencias biológicas y biomedicina, basada en revistas, reuniones, libros y patentes. Contiene más de 21 millones de registros desde 1926 de más de 5200 revistas. A través de Zoological Record proporciona información en biología animal y su taxonomía.

Limitaciones en la búsqueda de alternativas

Por muy diversas razones, la identificación de procedimientos alternativos empleados por otros científicos sigue siendo un proceso muy complejo. En primer lugar, la *indexación* actual de las publicaciones en las bases de datos bibliográficas no facilita la identificación de alternativas [13]. Por ejemplo, los términos clave que deberían ser básicos para este cometido, como “uso de alternativas a los animales, reducción, refinamiento...” no sólo se emplean con diversos significados en las diferentes bases de datos, sino que sólo se están asignando a una pequeña proporción de los artículos a los que les correspondería. Por ello, son poco útiles para recuperar la información, lo que obliga a utilizar en las búsquedas descriptores mucho más concretos. 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.

En segundo lugar, la información contenida en las *bases de datos* está limitada, además, por los sesgos de publicación, idioma, de cobertura, del patrocinador o de disponibilidad de acceso. Por ello es imprescindible buscar la información en varias bases de datos, ya que ésta se encuentra muy repartida. Debieran utilizarse tres tipos de

bases de datos: *bibliográficas* (Ej. PubMed, Agrícola, Embase, Biosis), *factuales* o de datos depurados (AnimAlt-Zebet, dbAlm) y de *información diversa y páginas web especializadas*: (AltWeb, Buscaalternativas.com). Además pueden ser muy útiles los sistemas de búsqueda simultánea en varias bases de datos a través de metabuscadores específicos y seguir las sugerencias de la Tabla 3 para la selección de las bases de datos.

Tabla 3. Criterios para la selección de las bases de datos sobre alternativas

-
- Tipos de bases de datos:
 - Bibliográficas (PubMed, Agrícola, Embase, Biosis)
 - Factuales o de datos depurados (AnimAlt-Zebet, dbAlm)
 - De información diversa y páginas web especializadas: (AltWeb, Buscaalternativas.com)
 - Criterios básicos de selección:
 - 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
-

Los *portales o buscadores generales o de amplio espectro* pueden ser apropiados 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 su 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*, dado que no tienen acceso a su información. Por lo tanto se encontrarán documentos concretos, pero no información depurada.

Quien 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. Lógicamente es preciso emplear el idioma de la base de datos. En el caso del inglés, puede ser conveniente usar determinadas palabras en sus modismos británicos y americanos (Ej. anaesthesia, anesthesia).

Además, para que las búsquedas sean productivas es necesario realizarlas *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. En primer lugar es preciso definir claramente qué información se desea encontrar. A continuación se recomienda preparar 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. A continuación se añaden o reducen los términos para obtener un número adecuado, es decir, suficiente pero no demasiado alto de resultados que permita manejarlos. Para ello, los términos suelen combinarse entre sí para reducir el número de respuestas, en las ventanas de búsqueda o con comandos de inclusión de ambos (y / and / +), inclusión de alguno (o / or), exclusión (no / not / -), frase exacta (“...”), etc.

Estrategias de búsqueda de alternativas

Es muy conveniente realizar una planificación previa, y seguir una secuencia de pasos protocolizados, que incluyen el registro de la metodología empleada que permita a cualquier persona repetir posteriormente la búsqueda y acceder a las mismas referencias o artículos. Para cada base de datos se sigue un proceso como el recomendado en la Tabla 4.

Tabla 4. Etapas en la búsqueda de información

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. Un número entre 10 y 60 registros 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

Las estrategias de búsqueda de alternativas, incluyendo las bases y fases recomendadas se incluyen en la Tabla 5. Es necesario utilizar varias bases de datos, recuperar documentos de los últimos 5-10 años y anotar todos los datos que permitan reproducir la búsqueda posteriormente.

Tabla 5. Bases y fases de la búsqueda de alternativas

| Bases | |
|-------|--|
| • | Deben emplearse siempre varias bases de datos |
| • | 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 |
| Fases | |
| 1 | Evitar la duplicación inútil de investigaciones |
| 2 | Búsqueda de alternativas de Reemplazo |
| 3 | Búsqueda de alternativas de Reducción y Refinamiento |
| 4 | Alternativas en estudios toxicológicos o de finalidad reguladora |
| 5 | Alternativas en la enseñanza y entrenamiento |
| 6 | Otras opciones |
| 8 | La ayuda de expertos |

A menos de que se trate de búsquedas de alternativas en la enseñanza o en estudios reguladores, para los que se recomienda acceder directamente a bases de datos específicas, en el resto de los casos debe procederse ordenadamente. En primer lugar debe evitarse la duplicación de investigaciones, para pasar a intentar encontrar alternativas de reemplazo. Si ello no fuera posible, se localizarían alternativas de reducción y refinamiento. Además de otras posibles opciones, como último recurso puede acudir al asesoramiento de expertos.

Búsqueda de alternativas de Reemplazo

Se recomienda iniciar la búsqueda en bases de datos generales como las ya indicadas, fundamentalmente *PubMed*. Además, expertos del Programa de Información sobre Toxicología y Salud Ambiental han desarrollado para la Biblioteca Nacional de Medicina Norteamericana el sistema *Altbib*, de Bibliografía sobre Alternativas al Empleo de Vertebrados vivos en Investigación Biomédica y Bioensayo. Sin embargo, lo más interesante de éste son las búsquedas predefinidas y actualizables (Live PubMed Searches) de procedimientos para diversos tipos de ensayos toxicológicos (<http://toxnet.nlm.nih.gov/altbib.html>).

Se inicia la búsqueda incluyendo términos que definan el *objetivo*

básico del estudio, no la metodología que se pretende usar (Ej. efectos *E. coli* hígado). Esto es muy importante, ya que hasta que se disponga de sistemas informáticos realmente expertos que sean capaces de localizar alternativas, debe evitarse en lo posible cercenar el ámbito de búsqueda. No debiera, por tanto, incluirse ni la especie, ni el tipo de agente o patología.

Una vez que se obtengan resultados, se intenta restringir la búsqueda a posibles modelos alternativos. Lamentablemente los descriptores que parecerían lógicos como “*alternatives*” no son demasiado útiles, pero conviene probarlos. En algunas bases de datos pueden ser útiles “*alternative, animal testing alternatives, animal use alternatives, replace*”. Finalmente, aunque no sea realmente exhaustivo, el descriptor más útil en estos momentos es “*vitro*”.

Por ejemplo, debe intentarse 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)

Si no se encuentra ninguna alternativa válida de sustitución, debiera revisarse cuales son los modelos animales ya utilizados por otros investigadores con similar finalidad y pasar al punto siguiente.

Búsqueda de alternativas de reducción y refinamiento

Si no se identifica ninguna opción de sustitución, será preciso centrarse en el empleo adecuado de animales. Debiera actualizarse el protocolo experimental teniendo en cuenta los últimos avances científico-técnicos en diseño experimental, para evitar estrés y dolor y reducir en lo posible el número de animales empleados.

Entre los descriptores que pudieran emplearse junto al término animal se encuentran muy diversos de refinamiento (*refinement, acclimation, quarantine, blood collection, cage, caging, housing, husbandry, injection, welfare, enrichment, behavioural, euthanasia, handling, distress, (non-)invasive, pain, stress, anaesthesia, analgesia...*) y de reducción (*reduction, experimental design, statistical analysis, model...*).

La localización en bases de datos generales de algunas publicaciones recientes con un protocolo similar puede ser muy útil y cómoda. 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 inspeccionando bases de datos y documentos específicos de reducción y refinamiento que ayuden en sus diferentes fases, desde las condiciones generales, la elección del sustrato biológico o la especie animal, el número y la distribución por grupo de los individuos, la selección de las dosis y grupos, la elección de la vía y el periodo de tratamiento, los marcadores y la toma de muestras, la terminación y eutanasia, el análisis de los resultados y el diseño del modelo predictivo. Como punto de partida se recomienda utilizar Buscaalternativas.com

Alternativas en estudios toxicológicos o de finalidad reguladora

Por las peculiaridades propias de las investigaciones toxicológicas, de seguridad química o de estudios con finalidad reguladora, es conveniente revisar en primer lugar las bases de datos específicas. Si se trata de un estudio regulado, será obligatorio seguir un procedimiento estandarizado, validado y aceptado por las autoridades reguladoras correspondientes para la evaluación de sustancias, medicamentos, plaguicidas, residuos, efluentes, etc. En la actualidad muchos de estos protocolos están siendo revisados para

adaptarlos a los criterios de las tres erres.

Pero, aunque se trate de una investigación básica no regulada por ninguna norma específica, es muy conveniente comprobar si existe alguna directriz regulada que pueda ser útil o adaptable para el objetivo propuesto. Si no está disponible un protocolo específico para la finalidad requerida, debe comenzarse desde el principio revisando las bases de datos generales, como PubMed y su sistema AltBib.

La *Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico* (OCDE) ha ido elaborando los métodos de ensayo estandarizados y legalmente válidos en la mayoría de los países para determinar las propiedades intrínsecas de las sustancias químicas. Su compleja página Web es reestructurada frecuentemente con lo que los enlaces directos se modifican. Dispone de protocolos de cinco tipos: determinación de propiedades fisicoquímicas, efectos en sistemas bióticos, degradación y acumulación, efectos sobre la salud (humana) y actividades especiales. Afortunadamente están ya disponibles en forma gratuita.

Los protocolos de ensayo de la *Unión Europea* coinciden aproximadamente en un 80 % con los de la OCDE, y pueden obtenerse gratuitamente ya que forman parte de la normativa REACH [14], al igual que los protocolos de ensayo de la *Agencia Medioambiental Norteamericana*.

El Laboratorio Europeo de Referencia para Alternativas al Ensayo con Animales (EURL-ECVAM) incluye en su base de datos db-ALM información sobre los procedimientos en fase de validación y aceptación, así como a los protocolos de INVITTOX, una base de datos de FRAME/ERGATT/ECVAM de métodos experimentales *in vitro*. Su contrapartida norteamericana, el *Comité Coordinador Interagencias de la Validación de Métodos Alternativos* (ICCVAM) y el Centro del Programa Nacional de Toxicología para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos (NICEATM) también informan sobre los procedimientos cuya validación están promoviendo.

AnimAlt-ZEBET es una base de datos de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal en Biomedicina y campos relacionados del Instituto Alemán de Documentación e Información Médica. Ofrece más de 140 documentos con revisiones muy bien documentadas sobre alternativas y permite además, la búsqueda simultánea en varias bases de datos como XMEDALL, XPHARMALL, XTOLLITALL, XVET.

Alternativas en la enseñanza y entrenamiento

Existen muy diversas modalidades de alternativas utilizables en la docencia [7,15], como se recoge en la Tabla 6. Se recomienda iniciar la búsqueda de Alternativas en la enseñanza y entrenamiento en bases de datos específicas. Son webs muy completas que recogen numerosas posibilidades en diferentes disciplinas sin precisar del empleo de animales. Sobre todo incluyen modelos mecánicos, audiovisuales y de simulación.

Tabla 6. Principales modalidades de procedimientos alternativos en la enseñanza y formación

1. Modelos mecánicos.
2. Sistemas audiovisuales: Películas, vídeos, CD-ROM, DVD.
3. Simulaciones por ordenador y sistemas de realidad virtual.
4. Ensayos *in vitro*: Ej. cultivos celulares.
5. Estudios de observación y de campo.
6. Materiales de desecho procedentes de mataderos.
7. Prácticas clínicas: humanas y veterinarias.

Si no se localizara un sistema adecuado, se podrían revisar, además, las bases de datos bibliográficas. En los sistemas generales pueden emplearse los términos “*education, training, teach*, instruct*, mannequin, manikin, simulat*, video, virtual, cadaver, software, computer...*”). También existen sistemas dirigidos a mejorar la preparación de las personas que manejan animales de experimentación.

Otras opciones

Muy diversas instituciones proporcionan información sobre alternativas. *Altweb* - Alternativas al Ensayo Animal, en la Web, del Centro Johns Hopkins de Alternativas al Ensayo con Animales es un sitio que recoge gran variedad de información, sobre todo de noticias, aunque puede resultar difícil discernir cuales son los documentos realmente interesantes (<http://altweb.jhsph.edu/searchalt.htm>).

La página de *Ecopa*- Plataforma Europea de Consenso sobre Alternativas a la Experimentación Animal recoge muy variada información, sobre todo de los proyectos de investigación sobre alternativas financiados por la Unión Europea. Otras páginas, como la de la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal- *REMA*, incluyen información actualizada y noticias sobre validación y aceptación de nuevas alternativas (<http://www.remanet.net>). A través de *Buscaalternativas.com* se facilita el acceso a estas páginas y a otras muchas (<http://buscaalternativas.com>), ver figura 1.

La ayuda de expertos y foros

Si no se encuentra información suficiente sobre alternativas en las bases de datos disponibles, se puede solicitar la ayuda de expertos, bien directamente o en foros científicos de debate. Pueden localizarse equipos de investigación que emplean tecnologías alternativas en diversas bases de datos, como el Inventario de las Instituciones y Científicos Españoles Interesados en Métodos Alternativos al uso de Animales de Experimentación [16].

Los profesionales afines interaccionan entre sí y debaten en diversos foros y redes temáticas en Internet sobre alternativas y experimentación animal, como son *3Erres*- Foro de Alternativas a la Experimentación animal, *SECAL-L*: Foro de la Sociedad Española para las Ciencias del animal de Laboratorio, *Toxicol*- Foro de Toxicología, *Farmacol*- Foro de Farmacología, *COMP MED* – Lista de Discusión sobre Medicina Comparada o el Foro del Comité sobre el Uso y Cuidado Animal (IACUC), que son lugares muy adecuados donde plantear cuestiones sobre alternativas no resueltas por otras vías.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente gracias a una ayuda de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia y fondos FEDER, con cargo al proyecto CTM2012-31344

Bibliografía

1. UE (2010) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. DOCE L276 20/10/2010: 33-79. . (Consulta: 20/09/2014).
2. E (2013) Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los

- animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. BOE 34 8/2/2013: 11370-11421 (Consulta: 20/09/2014).
3. Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principles of Human Experimental Technique*. Methuen, Londres.
 4. Repetto G (1995) Recientes avances en la validación y aceptación de métodos alternativos *in vivo e in vitro*. *Rev Toxicol* 12:3-9.
 5. Das RG, Fry D, Preziosi R, Hudson M (2009) Diagrama de Planificación Estratégica para Reducir el Uso de Animales en Ciencia Biomédica *ATLA* 37, 27-32.
 6. Repetto M, Repetto G (2009) *Toxicología Fundamental*. 4ª ed. Editorial Díaz de Santos. Madrid.
 7. Castaño A, Repetto G (2009) *Métodos alternativos. Generalidades*. Capítulo 25 *En Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal*, Martín Zúñiga J, Nora S, Universidad de Alcalá.
 8. Langley G, Broadhead C, Bottrill K, Combes B, Ewbank R, Hawkins P, Hubrecht R, Jennings M, Newman C, Rowe S, Southey 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.
 9. Hakkinen PJ, Green DK (2002) Alternatives to animal testing: information resources via the Internet and World Wide Web. *Toxicology* 173:3-11.
 10. Bottrill K (2004) Search strategies on the internet: general and specific. *ATLA* 32S1: 585-589.
 11. Grune B, Dörendahl A, Köhler-Hahn D, Feuerstein C, Box R, Wohlgenuth H, Spielmann H (2004) New Sources for Alternative Methods on the Internet: The Objectives of Databases and Web Sites *ATLA* 32S1:573-582.
 12. 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* 21:115.
 13. Roi AJ, Richmond J, Grune B (2013) *The EURL ECVAM search guide. Good search practice on animal alternatives*. 2nd Ed. European Commission, Joint Research Centre. Enlace: <http://bookshop.europa.eu/en/the-eurl-ecvam-search-guide-pbLBN124391/>. (Consulta: 20/09/2014).
 14. CE (2008) Reglamento (CE) n° 440/2008 de la Comisión, de 30 de mayo de 2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH).
 15. Vinardell MP (2014) Alternativas a los animales de laboratorio en docencia. *Rev Toxicol* 31:124-129.
 16. Repetto G, del Peso A, Salguero M, Repetto M (1999) Inventory of the Spanish Institutions and Scientists Involved in Alternatives to the use of Laboratory Animals (Refinement, Reduction or Replacement). *Rev Toxicol* 16:50-127. Disponible en: <http://aetox-pull.diffunditdisenoc.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2011/12/99-Inventario-Espa%C3%B1ol-sobre-alternativas-Repetto-1999.pdf> (Consulta: 20/09/2014).