

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS RECOMENDABLES PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

MVZ M. en C. Jaime Alonso Navarro Hernández
MVZ Roberto Aarón Ramírez Ojeda
MVZ Carlos Villagrán Vélez

SAMSARA

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS RECOMENDABLES
PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS RECOMENDABLES PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

MVZ M. en C. Jaime Alonso Navarro Hernández
MVZ Roberto Aarón Ramírez Ojeda
MVZ Carlos Villagrán Vélez

SAMSARA
2012

Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales
MVZ M. en C. Jaime Alonso Navarro Hernández, MVZ Roberto Aarón Ramírez Ojeda
MVZ Carlos Villagrán Vélez

Primera edición, octubre 2012

© Samsara Editorial, 2012
www.samsaraeditorial.com

© MVZ M. en C. Jaime Alonso Navarro Hernández, 2012.
© MVZ Roberto Aarón Ramírez Ojeda, 2012.
© MVZ Carlos Villagrán Vélez, 2012.

PORTADA:
Ab imo pectore
© Marco Zamudio

DISEÑO DE INTERIORES:
© Sergio A. Santiago Madariaga
maquinahamlet@gmail.com

Agradeciendo especial a Karla Velázquez Betancourt y Alma Rosa Cruz Delgado por la revisión textual.

Reservados todos los derechos. Prohibida la reproducción total
y parcial sin autorización de la editorial.

Impreso en México / Printed in Mexico

ISBN 978-970-94-2830-8

ÍNDICE

PRÓLOGO

DR. LUTZ ALEXANDER KEFERSTEIN CABALLERO | 11

PRIMERA PARTE: INTRODUCCIÓN

- 1.1 *La Investigación Científica* | 16
- 1.2 *Origen del Uso de Animales en Experimentos* | 17

SEGUNDA PARTE: CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS Y ÉTICAS PREVIAS AL DISEÑO

- 2.1 *Selección del Área y Tópico de Interés* | 21
- 2.2 *Determinación de la Factibilidad del Estudio* | 25
- 2.3 *Protocolo de Investigación* | 26
- 2.4 *La pregunta de Investigación* | 29

3. DESARROLLO DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN | 30

- 3.1 *Título del Proyecto* | 30
- 3.2 *Justificación del Proyecto* | 30
 - 3.2.1 *Declaración del Problema* | 31
 - 3.2.2 *Marco Teórico* | 32
 - 3.2.2.1 *Revisión Sistemática* | 33
 - 3.2.2.2 *Necesidad de hacer Revisiones Sistemáticas* | 34
 - 3.2.3 *Argumentación para Usar Animales en la Investigación, Enseñanza y Constatación* | 34
- 3.3 *Objetivos de Investigación* | 36
- 3.4 *Formulación de Hipótesis* | 37

4. CUMPLIMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS EN LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES | 40

- 4.1 *El Reemplazo de los Animales en los Experimentos, la Reducción del Número y Refinamiento de la Técnica* | 43
- 4.2 *Controles Legales y Justificaciones Éticas y Científicas* | 45
- 4.3 *Premisas para Alternativas de Reducción* | 45
- 4.4 *Premisas para Alternativas de Refinamiento* | 45
- 4.5 *Premisas para Alternativas de Reemplazo* | 46
- 4.6 *Educación y Entrenamiento* | 46

5. LA CORRECTA SELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL | 47

- 5.1 *El Concepto de Modelo Animal* | 48
- 5.2 *¿Qué es un Modelo Animal?* | 48
- 5.3 *Clasificación de los Modelos Animales* | 50
- 5.4 *Clasificación de los Modelos de Enfermedad* | 50
 - 5.4.1 *Modelos Animales de Enfermedad Inducidos (experimentales)* | 51
 - 5.4.2 *Modelos Animales de Enfermedad Espontáneos* | 51
 - 5.4.3 *Modelos de Enfermedad Transgénicos* | 52
 - 5.4.4 *Modelos de Enfermedad Negativos* | 54
 - 5.4.5 *Modelos de Enfermedad Huérfanos* | 54
- 5.5 *Criterio de Selección del Modelo Correcto* | 55
- 5.6 *Extrapolación de Animales a Humanos* | 57
 - 5.6.1 *Requerimientos Generales para la Extrapolación* | 57
- 5.7 *Descripción de los Modelos Animales* | 60
- 5.8 *El Ratón en la Investigación* | 61
- 5.9 *El Conejo en la Investigación* | 62
- 5.10 *El Gato en la Investigación* | 62
- 5.11 *El Perro en la Investigación* | 63
- 5.12 *Los Primates No-Humanos en la Investigación* | 64
- 5.13 *Otros Animales* | 65
- 5.14 *Avances en Medicina Veterinaria* | 65

6. IDENTIFICACIÓN DEL DOLOR, SU TRATAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DEL PUNTO FINAL ANTICIPADO EN LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES | 65

- 6.1 *Reconocimiento del Dolor* | 68
 - 6.1.1 *Indicadores de Dolor en Algunos Animales de Laboratorio* | 70
 - 6.1.2 *Tratamiento del Dolor* | 71
- 6.2 *Guías para Seleccionar un Punto Final Humanitario durante la Experimentación Utilizando Animales* | 72
- 6.3 *Signos para Evaluar Morbidez en Animales: Estado Mórbido* | 73
- 6.4 *Signos para Evaluar Estado Agónico o Moribundo (fase terminal)* | 74
- 6.5 *Algunos Criterios de Ayuda para Aplicar la Eutanasia en Animales en Experimentación* | 75

**TERCERA PARTE:
METODOLOGÍA DEL ESTUDIO, PRESENTACIÓN DE RESULTADOS
Y ORGANIZACIÓN DE LOS RECURSOS**

7.1 *Tipo de Estudio* | 78

7.2 *Diseño de Experimentos Con Animales* | 78

8 ELEMENTOS DE UN BUEN DISEÑO DE EXPERIMENTO | 79

8.1 *Estudios Preliminares o Piloto* | 79

8.1.1 *Logística que puede Surgir de un Estudio Piloto* | 79

8.1.2 *Uso de los Datos y la Información Obtenida* | 80

8.2 *Unidad Experimental (UE)* | 80

8.3 *Sesgo* | 80

8.3.1 *Evitando el Sesgo: Aleatorización* | 81

8.3.1.1 *Métodos de Aleatorización* | 81

8.3.2 *Evitando el Sesgo: Cegamiento* | 82

8.3.2.1 *Método de Cegamiento* | 82

8.4 *Población de Estudio* | 82

8.4.1 *Niveles de Población* | 82

8.5 *Grupos de Control* | 83

8.5.1 *Controles Positivos* | 83

8.5.2 *Controles Negativos* | 83

8.5.3 *Controles Falsos* | 83

8.5.4 *Controles Vehículos* | 84

8.5.5 *Controles Comparativos* | 84

**9. CONCEPTOS PRÁCTICOS DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS,
AUXILIARES PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES** | 83

9.1 *Aleatorización* | 87

9.2 *Replicación* | 87

9.3 *Bloqueo (Control Local)* | 87

9.4 *Plan General para el Diseño y Ejecución de un Experimento* | 88

**10. DEFINICIÓN DE LOS ELEMENTOS CRÍTICOS
PARA SELECCIONAR UN DISEÑO** | 90

10.1 *Medida de Efecto o Respuesta* | 90

10.2 *Modelo Estadístico* | 90

**11. CRITERIOS AUXILIARES PARA LA SELECCIÓN
DEL PATRÓN (ESTRUCTURA) DEL DISEÑO** | 92

11.1 *Diseños Pre-experimentales* | 92

11.2 *Diseños Cuasiexperimentales* | 93

11.3 *Diseños Experimentales* | 94

11.3.1 *Paradigmas de Diseños Experimentales Básicos* | 96

11.4 *Tipos de Diseño Experimental* | 100

11.4.1	<i>En Paralelo</i>	100
11.4.2	<i>En Bloques</i>	102
11.4.3	<i>En Bloques Aleatorios</i>	103
11.4.4	<i>“Cross-over”, o Cruzado</i>	104
11.4.5	<i>Factorial</i>	106
11.4.6	<i>“Split-plot” o de Parcelas Divididas</i>	108
12.	CÁLCULO DEL TAMAÑO DEL EXPERIMENTO	 109
13.	CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA	 112
13.1	<i>El Poder</i>	113
13.2	<i>La Significación</i>	114
13.3	<i>El Tamaño del Efecto</i>	114
14	LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES FUERA DEL LABORATORIO	 114
14.1	<i>Tipos de Experimentación en Granjas</i>	115
14.2	<i>Opciones de Diseño</i>	115
14.2.1	<i>Experimentos entre Animales (entre sujetos)</i>	116
14.2.2	<i>Experimentos en los Mismos Animales (Intrasujetos)</i>	116
14.3	<i>Explicación de la Variación</i>	118
14.4	<i>Número de Granjas Requeridas</i>	118
14.5	<i>Determinación del Tamaño de la Muestra</i>	119
14.6	<i>Consideraciones Estadísticas</i>	119
15.	PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS	 120
15.1	<i>Gráficas y Cuadros</i>	121
15.2	<i>Tablas</i>	122
16.	ORGANIZACIÓN DE LOS RECURSOS	 123
16.1	<i>Denominación de la Unidad de Investigación</i>	123
16.2	<i>Tamaño</i>	124
16.3	<i>Autonomía</i>	124
16.4	<i>Aglutinación</i>	124
16.4.1	<i>Aglutinación de las Unidades por Especialización</i>	124
16.4.2	<i>Aglutinación de las Unidades por líneas de investigación</i>	124
16.5	<i>Categorías de Personal en Función de sus Responsabilidades</i>	125
16.6	<i>Gestión de Recursos</i>	125
16.6.1	<i>Recursos Humanos</i>	125
16.6.2	<i>Recursos Financieros</i>	126
16.6.3	<i>Buenas Prácticas de Laboratorio</i>	126

**CUARTA PARTE:
CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES**

17. EL AMBIENTE Y EL MANEJO DE LOS ANIMALES:

UNA VARIABLE NO EXPERIMENTAL | 129

17.1 *Factores Físicos* | 130

17.1.1 *Diseño de la Caja* | 130

17.1.2 *Temperatura y Humedad* | 130

17.1.3 *Ventilación* | 131

17.1.4 *Luz* | 132

17.1.5 *Ruido* | 133

17.1.6 *Accesorios de las Cajas* | 133

17.1.7 *Tamaño de la Caja y Número de Animales Alojados* | 134

17.1.8 *Transporte* | 134

17.1.9 *Manejo* | 134

17.2 *Factores Químicos* | 135

17.2.1 *Alimento y Agua* | 136

17.2.2 *Fármacos* | 136

17.3 *Factores Microbiológicos* | 137

17.3.1 *Enfermedades Bacterianas* | 137

17.3.2 *Enfermedades Virales* | 138

17.3.3 *Enfermedades Parasitarias* | 138

**18. LINEAMIENTOS GENERALES EN LA REVISIÓN DE PROTOCOLOS DE
EXPERIMENTACIÓN EN DONDE SE UTILIZAN ANIMALES (Canadian
Council on Animal Care | 140**

REFERENCIAS | 147

SEMBLANZAS BIOGRÁFICAS DE LOS AUTORES | 155

DEDICATORIAS

AARÓN

A mis *nous*, Marlene y Fausto.

JAIME

Mi Madre y Maestra: Adelita Hernández Mendieta.

CARLOS

Para mi hija Mariana, el ser más importante en mi vida, ¡ánima que anima!

PRÓLOGO

Emocionalmente hablando, no es nada sencillo para una persona que, como yo, se ha embarcado en la decisión moral de volverse vegetariano por ya casi 17 años (tomé la decisión en octubre de 1995), escribir el prólogo de un libro que, finalmente, concluye la necesidad de la experimentación sobre animales en aras de un pretendido bien jerárquicamente superior, esto es, el bienestar humano. No aminora la dificultad el hecho de que la postura de los MVZs Navarro Hernández, Ramírez Ojeda y Villagrán Vélez, respecto de la legitimidad tanto legal como ética de la experimentación sobre los otros seres racionales que comparten este mundo requiera de un estricto apego a las reglas propuestas por el manual que tiene ahora usted en sus manos. Esta dificultad no significa, sin embargo, que no se pueda ser objetivo al momento de analizar las propuestas de los autores de este libro, pues el amor que siento por los animales es extendido al género humano en su noción universal. Finalmente, nosotros, también, le pese a quien le pese, somos animales.

Espero que le haya llamado la atención la afirmación arriba realizada de una manera franca y directa respecto de la racionalidad existente en los animales. Es sin duda controversial si partimos de un elemento discursivo auto-otorgado y aceptado objetivamente por una enorme cantidad de comunidades del lenguaje respecto de que los humanos nos distinguimos de los animales por nuestra racionalidad, de tal manera que la razón se ha convertido en la concepción de muchas personas, sin poder deslindarme al cien por ciento de tales discursos, en la esencia de los seres humanos. La esencia es, lo afirmaré escuetamente por el momento, aquello que nos hace a algo ser lo que es distinguiéndolo de todo lo demás. El que parcialmente acepte este entendimiento de esencia humana no significa, sin embargo, que acepte que la razón sea una propiedad exclusiva nuestra.

El paso que dio el hombre desde su condición de animalidad a la, al menos así reconocida, condición de humanidad se muestra misterioso. Cualquier propuesta tanto filosófica como biologicista usada para responder a la pregunta de lo que Engels llamaría *la transformación del mono en hombre* resultarán siempre y finalmente simples acercamientos, propuestas, consideraciones al proceso que en realidad¹ nos llevó a dar ese salto cualitativo, el cual nunca podremos conocer empíricamente. Algunas consideraciones al respecto se presentan ahora. La esencia de algo es la característica o características necesaria(s) inherente(s) a todos los individuos cuando son considerados como todos juntos conformando un género determinado. Esto es axiomático y no requiere mayor prueba. Por lo tanto, si una de o todas esas características –en caso de que su existencia simultanea en el individuo sea considerada como necesaria – no se encuentra(n) presente(s) y debido a ello todos los individuos dejan de ser lo que eran, esa característica o características deberá(n) ser entendidas como la esencia de ese género. Así, encontrándose la esencia se puede especular por el momento de la diferenciación.

¹ En el sentido de *matters of fact*, esto es, cuestiones relativas al mundo de los hechos y no de los conceptos.

Dicho lo anterior, permítaseme hacer un breve acercamiento a la respuesta kantiana y las implicaciones que, se podría pensar, ésta ha tenido no sólo para las posteriores doctrinas filosóficas, sino en la transformación misma de las bases del pensamiento occidental y moderno que han dado como resultado precisamente la sociedad occidental, occidentalizante y moderna como se nos presenta hoy en día.

Kant propone un determinado acercamiento al momento en que el hombre se identifica de la animalidad que al menos ha logrado el consenso suficiente para hacerlo objetivo. El discurso predominante es el que afirma la razón como la distinción fundamental entre los animales y el humano. Hago referencia, obviamente, sólo a los discursos seculares. Para Kant, la esencia del hombre es la razón pura, la cual es tanto especulativa como práctica.

Dada la definición anterior de esencia, en el caso del hombre, se considera que la única característica que no puede cesar de permearle es una razón que tiene que tener la capacidad de saber *a priori* y nos otorgue al mismo tiempo la capacidad de transformar la realidad de manera consciente². Es, no obstante, evidente que todo hombre tiene deseos, emociones, sentimientos, necesidades físicas y una larga lista de otras facultades innegablemente necesarias a su condición de ser vivo existente. Es entonces que dichas facultades no son exclusivas del hombre sino de aquellos animales con un sistema nervioso-central y neuronal más desarrollado. Kant reafirmará por eso mismo que la única particularidad que distingue a nuestra clase es una razón pura que sea al mismo tiempo especulativa y práctica. Esto es cierto pues aunque los animales tienen razón pura, lo cual es obvio toda vez que ellos concluyen rudimentariamente tanto como pueden, no dirigen sus acciones de acuerdo a leyes y reglas prácticas –principios morales o imperativos hipotéticos– dadas por ellos mismos, principal característica del lado práctico de la razón humana. Así, el hombre es naturalmente emotivo e impulsivo y esencialmente racional. Es importante marcar la diferencia entre estos dos términos por más sutil que se pudiera encontrar. De acuerdo a Kant, la naturaleza está constituida de tal manera que la materia de nuestra facultad de anhelar (*Begehrungsvermögen*) es primordial –pues ésta garantiza hasta cierto punto la auto-conservación–³, y estamos, por consiguiente y como se mencionó, determinados patológicamente por inclinaciones, miedo, ira, alegría, etc.⁴. Esto ocurre en Kant, sin embargo, sólo cuando somos considerados meramente como seres sensibles, esto es, llanamente reactivos. Caso contrario es el de nuestra esencia, la cual, conforme a su definición, no puede ser nada más que la razón pura y práctica autónoma, pues si bien los animales son racionales, hasta donde los humanos comprendemos no son autónomos. Kant es finalmente determinante cuando afirma: “(...) *el hombre encuentra en sí mismo una facultad por medio de la cual se distingue de todo lo demás, inclusive de sí mismo como afectado por objetos, y esa es la razón*”⁵.

La razón humana adquiere su particularidad en tanto que nos confiere una libertad de la que carecen los animales. Intentar entender la libertad como la capacidad de romper con las

² De esta capacidad esencial, resulta claro, se derivan –o al menos constituye la condición de posibilidad de– las facultades ética y estética del humano.

³ KANT, I., *Mutmaßlicher Anfang der Menschengeschichte* (MAMG), AA. VIII p. 111

⁴ KANT, I., Cf. *Kritik der praktischen Vernunft* (K.p.V.), AA V, p. 74.

⁵ En el original: “Nun findet der Mensch in sich wirklich ein Vermögen, dadurch er sich von allen andern Dingen, ja von sich selbst, so fern er durch Gegenstände afficirt wird, unterscheidet, und das ist die Vernunft”. KANT, I., *Grundlegung zur Metaphysic der Sitten* (GMS), AA IV, p. 452.

relaciones de *necesidad* que conllevan las leyes naturales, esto es los patrones que los humanos encontramos en el mundo y que aparecen no dependiendo de nosotros ni de nuestra voluntad, resulta tan fructífero como buscar la quinta pata del gato. Propongo entonces que se haga la distinción entre leyes naturales y orden natural, al cual entiendo como *el resultado de estas leyes operando sin que ser alguno, las emplee conscientemente para que el mundo se transforme en conformidad con su capacidad de imaginación*. Vista la existencia desde esta perspectiva, la libertad no provendría de la capacidad de violentar las leyes de necesidad –capacidad por otra parte inexistente– sino de la de alterar el orden natural. La libertad se originaría al usar estas leyes para transformar el mundo de como sería sin la existencia del hombre para que se amolde a lo que su imaginación le presenta. Su origen sería la unión de la capacidad de conciencia del hombre que ubica su existencia en medio de un mundo sujeto a leyes, y su facultad de entender, la cual le permite comprender la operacionalidad de aquellas y emplearla. Esto simplificado: de un uso consciente de sus facultades y de las posibilidades de manejo de las leyes naturales. Esta postura coloca la libertad en un sistema humano, cerrado y coherente con los fenómenos del mundo. Esto es testificado a cada momento por la vida del hombre. En otras palabras, el ser en sentido ontológico se relaciona con las leyes naturales y es inalterable (soy humano – 23 pares de cromosomas ordenados de *x* manera–, soy mujer –gameto *xx*–, etc.). El hacer se relaciona con el orden natural y puede *utilizar* las leyes naturales conocidas conscientemente. La libertad se vincula directamente con el *hacer* y sólo con el *ser* cuando esto no se entiende en sentido ontológico, sino como una palabra que expresa la construcción de uno mismo por medio de acciones que le identifican consigo al tiempo que con algo ajeno a su más simple definición (como cuando se dice: soy artesano, soy doctor, soy bueno, soy malo, etc.), o sea con una forma específica de *hacer*.

Por otro lado, en mi entender, el instinto no tiene como finalidad la vida, sino como origen e identidad. Es una forma operacional perteneciente a ella que genera un círculo de regeneración, un impulso que guía tanto a los animales como al hombre⁶ en su propia lógica básica de preservación. La vida se genera a si misma de la forma más cercana posible al *ipse alimenta sibi*. Ahora bien, que todos los seres vivos llevan a cabo actos de confrontación, colaboración y hasta simbiosis entre ellos que facilitan la preservación de la vida en lo general es algo evidente a la par que ya tratado con seriedad filosóficamente tanto en el pensamiento europeo como en el oriental, aunque presentado de distinta manera⁷. De ello se desprende que cualquier ser vivo, por principios naturales de supervivencia, *asemeja* actos de dominación sobre quienes ponen en peligro su supremacía o sobre quienes la garantizan por medio de su cuerpo, de su carne, de su muerte misma transformada ahora en vida para el primero y en general para la especie, la cual, con la supervivencia de sus individuos consigue hallarse en posición de conservación. Los seres humanos, por ser animales, tenemos instintos, pero, por lo dicho en las páginas anteriores,

⁶ KANT, I. *Anthropologie in pragmatischer Hinsicht* (APH), AA VII, § 42, pp. 197-199.

⁷ Vid: SCHOPENHAUER, Arthur, *Die Welt als Willen und Vorstellung I* (WWV I), en *Sämtliche Werke* (SW), nach der ersten ausgabe von Julius Frauenstadt, besorgten Gesamtausgabe neu bearbeitet und herausgegeben von Arthtur Hübscher, vierte Auflage durchgesehen von Angelika Hübscher, Brockhaus, Mannheim, 1988, § 27, pp. 165-182. Esta idea expresada y argumentada en los capítulos referentes al mundo como voluntad, encuentra un claro ejemplo de su proceso, descrito, estéticamente hablando, de una manera magnánima, como lo era casi todo lo emanado de la pluma de Schopenhauer.

podemos regular sus maneras de expresión mediante leyes autónomas que transforman el mundo y nos transforman a nosotros mismos.

El libro que tiene usted lector en sus manos, el Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales de MVZ M en C Navarro Hernández Jaime Alonso; MVZ Ramírez Ojeda Roberto Aarón; MVZ Villagrán Vélez Carlos es una clara muestra de todo esto. El humano concibiendo su derecho a la supervivencia por medio de actos que asemejan dominación en aparente apego a las leyes naturales, puede y debe darles una forma autónomamente regulada conforme a lineamientos apegados a obligaciones morales, que respeten y partan de la obligación que tenemos los humanos de concederles dignidad a los seres que co-existen en esta masa de tierra espacial para no seguir siendo el brutal animal dominante del planeta que, por su propias características biológicas ha estado en la capacidad de salir de toda cadena y proceso de cooperación ecosistémica.

DR. LUTZ ALEXANDER KEFERSTEIN CABALLERO

PRIMERA PARTE

INTRODUCCIÓN

1.1 La Investigación Científica

La ciencia es un proceso que tiene por objetivo elaborar y adquirir conocimiento comprobado, reproducible por la práctica en diferentes esferas de la actividad humana, que permita comprender los fenómenos desde un punto de vista general y no solamente de acontecimientos y situaciones aisladas.^(1,2) Así, como proceso, conlleva la actividad de descubrir variables importantes de la naturaleza, sus relaciones de causalidad-dependencia y de explicar las leyes que las rigen.⁽³⁾ Constituye una lógica de la búsqueda y el cuestionamiento, o una metodología específica, que intenta resolver problemas y adquirir un cuerpo de conocimiento integrado.⁽⁴⁾ Este proceso se explica en la figura 1.

La adquisición de conocimiento científico, está basada en el estudio de la realidad, entendida como un determinado problema, evitando catalogar conocimientos erróneos como verdaderos. Es a través de la aplicación de distintos métodos de investigación, libres de creencias, percepciones, sesgos, valores, actitudes y emociones personales, por los que el investigador pretende comprender, explicar, predecir o controlar fenómenos.

La investigación científica es una actividad humana, orientada a dar respuesta a preguntas relacionadas con el conocimiento acerca del funcionamiento del mundo y del universo. Es un proceso sistemático, organizado y objetivo, destinado a responder un problema soluble o una pregunta. El conocimiento científico alcanzado es dependiente, debido a que, finalmente, está basado en la evidencia observada de forma objetiva.^(1, 2,4)

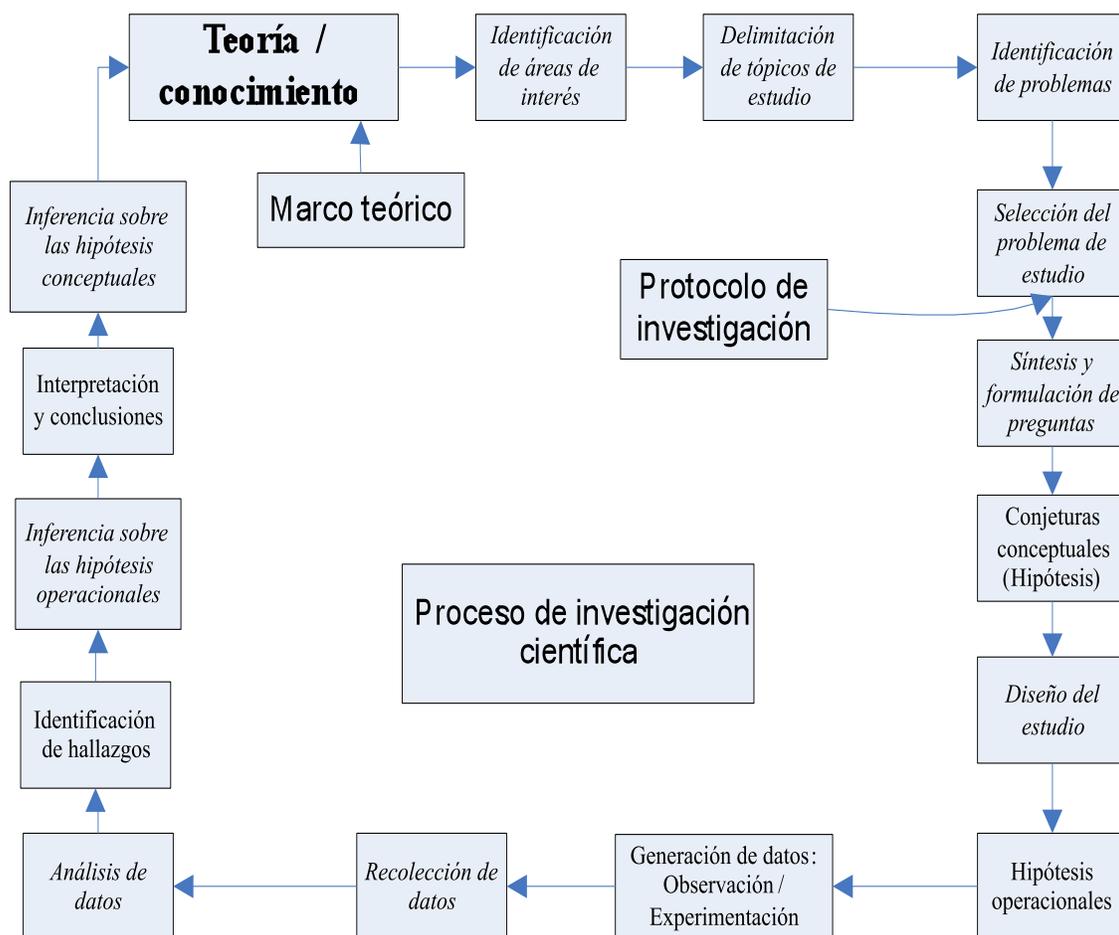


Figura 1. Modelo conceptual del proceso de investigación científica. Navarro HJA 2010

1.2 Origen del Uso de Animales en Experimentos

Aunque se reconoce que el progreso de la investigación científica desarrollada en todas las áreas biomédicas repercute en la mejor calidad de vida de los seres vivos, la experimentación con animales, ha sido un tema de controversia pública desde mediados del siglo XVIII. Al comienzo del siglo diecinueve, los experimentos con animales emergieron como un importante método de la ciencia; lo cual marcó el surgimiento de la fisiología y las neurociencias experimentales, tal como se conocen en la actualidad.

El primer registro del uso de animales vivos, fue un estudio de humores corporales efectuado por Erasistrato, en Alejandría en el siglo tercero a. C. Después, el médico Galeno (129 – 200 d.C.) usó cerdos vivos para investigar las funciones de varios nervios y también demostrar la posición de los uréteres. En el Renacimiento surgieron nuevos intereses en el saber médico. Andreas Vesalius (1514–1564) condujo varios experimentos en monos, cerdos y cabras, de los cuales hizo dibujos anatómicos muy precisos y desafió algunos de

los conceptos de Galeno, entonces ya obsoletos. Entre otros eruditos que condujeron experimentos con animales, se encuentran: Francis Bacon (1561–1626), William Harvey (1578–1657) (cuyos estudios en venados vivos y algunas otras especies de animales, condujeron al importante descubrimiento de la circulación sanguínea), Anthony van Leeuwenhoek (1632–1723) y Stephen Hales (1677–1761). Para el final del siglo XVII, emergió una fuerte tradición en Inglaterra y Francia de la experimentación con animales, basada en la noción de que éstos son incapaces de sentir dolor. El camino había sido abierto para ésta opinión, por el filósofo francés Rene Descartes (1596–1650), cuyas ideas, tales como “el más grande de todos los prejuicios que retenemos desde nuestra infancia es aquel de que las bestias piensan”. Dos fisiólogos franceses, Francois Magendie (1783–1855) y su alumno Claude Bernard (1813–1878) refutaron los métodos existentes, y postularon innovaciones, estableciendo la experimentación y los principios científicos para experimentar con animales vivos, como una práctica común.⁽⁵⁾

Probablemente, el científico más frecuentemente citado en la progresión del uso de animales en la investigación médica es Claude Bernard, cuyo trabajo “*Una Introducción a la Medicina Experimental*” es considerado un clásico. Bernard produjo muchos conceptos y observaciones importantes, y de él fue la idea de que la observación en la especie animal adecuada es la clave científica para las observaciones relevantes de la situación humana bajo estudio. Esto es, la base del experimento completo reside en la selección del animal apropiado. Luis Pasteur también fue uno de los primeros que utilizó animales en la investigación; llevó a cabo experimentos notables sobre ántrax en ovejas y rabia en perros. Pasteur no se limitó a los mamíferos, también estudió las enfermedades de los gusanos de seda. Hay suficiente evidencia de que Pasteur se sentía incómodo al experimentar con animales vivos, sin embargo, sabía que en su tiempo no había otra forma para generar y obtener la información científica necesaria. A mediados del siglo XIX, en Alemania, Rudolph Virchow y Emil Behring condujeron experimentos con animales en patología y bacteriología experimental, al igual que Robert Koch, cuyo nombre es asociado con investigaciones en enfermedades infecciosas. Para la segunda mitad del siglo, el fisiólogo ruso Iván Pavlov, llevó a cabo sus famosos experimentos sobre el sistema nervioso autónomo y su relación funcional con el aparato digestivo del perro. Quizá no haya otra frase relacionada al uso de animales en la investigación tan usada como “los perros de Pavlov”.⁽⁶⁾ El trabajo de fisiólogos como Magendie y Bernard, aunado con el descubrimiento de las propiedades anestésicas del éter (por Crawford Long en 1842, y William Morton en 1847), resultó en la adopción de procedimientos quirúrgicos técnicamente más sofisticados. La experimentación con animales, en toda Europa, se hizo una práctica común en los laboratorios de fisiología. En Gran Bretaña, el *Acta de Crueldad a los Animales de 1876*, exigió un cuidadoso registro de animales de investigación utilizados cada año en los experimentos. Estos registros demuestran que el número de procedimientos que utilizaron animales para investigación, aumentó de 311, en 1880, a cerca de 95 000 en 1910.⁽⁷⁾

El periodo entre 1900 y 1940, estuvo marcado por el uso continuo de animales en la investigación médica, particularmente en las áreas de cirugía y fisiología. El desarrollo de la ciencia y medicina de los animales de laboratorio en los Estados Unidos fue resultado directo del uso de animales en la investigación.

Con el incremento del uso de animales, surgió simultáneamente el reconocimiento, por parte de la comunidad científica y de la sociedad, de que son necesarios tanto lineamientos, como leyes, para asegurar la apropiada adquisición y uso de los animales en la investigación científica. Así, en 1963, fue publicada la primera edición de lo que se conoce como la *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*, y el Servicio de Salud Pública comenzó a exigir a todos los que recibían apoyo financiero para investigar, la justificación plena del uso de los animales; asimismo implicaba el apearse estrictamente a los lineamientos de ese documento.⁽⁶⁾

En Gran Bretaña, la cantidad de animales utilizados en experimentos se incrementó hasta exceder un millón por año en 1943 y cinco millones por año a mediados de los años 70. Las cantidades habrían disminuido a tres millones en 1991, y descendieron a 2.7 millones en 1997.⁽⁷⁾

En México, aunque no se tiene un censo al respecto, sí se cuenta con una normatividad interna que tiene por objeto establecer y uniformar las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio que deben cumplir todas las personas relacionadas, en todos los campos, con este tipo de animales.⁽⁸⁾

El presente manual se justifica, dado que no existe un patrón de referencia único de la planeación y del diseño correcto de experimentos, a partir del cual los investigadores, técnicos, tesistas y usuarios en general del área biomédica, se basen para planear y diseñar correctamente una investigación científica en la que se utilicen animales, para juzgar si las prácticas del cuidado, uso y manejo adecuado de los animales, sujetos de la experimentación, propuestas en los protocolos, se sustentan en metodología científica y buenas prácticas de investigación, que sean apropiadas y aprobadas por organismos internacionales y si se justifica el uso ético, racional y humanitario de los animales.

SEGUNDA PARTE

CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS Y ÉTICAS PREVIAS AL DISEÑO

2.1 Selección del Área y el Tópico de Interés

El área de estudio de un problema de investigación incluye el universo de hechos y conceptos teóricos y sus relaciones como lo muestra la figura 2. Constituye la fuente de ideas o de temas sobre posibles problemas de investigación. Debido a la inmensa cantidad de fuentes de información que puede tener un área de estudio, el problema se selecciona a partir de unos cuantos tópicos, localizados generalmente en una misma área.

La selección del tópico no induce al investigador a comenzar inmediatamente a considerar los datos que debe recolectar, o qué métodos debe usar y cómo los analizará. Se necesita formular un problema específico investigable por procedimientos científicos. Es superficial pensar que se va a conocer la verdad estudiando sólo los hechos sin haber identificado la dificultad en una situación teórica o práctica. Entre los factores importantes que determinan la selección del problema de investigación están las preferencias personales del investigador, las que a su vez, pueden estar influidas por sus creencias, sus valores y los intereses personales (prestigio profesional, ingresos financieros) y sociales; son el “componente *‘visceral’* de toda investigación” (**). Por ejemplo, se destina más dinero para investigación de experimentos no controvertibles con animales que para estudios que puedan tener repercusiones políticas y es mejor pagada la investigación de mercado que la de psicología educativa o de protección al ambiente.

** INFANTE CC, 2002 Comunicación personal.

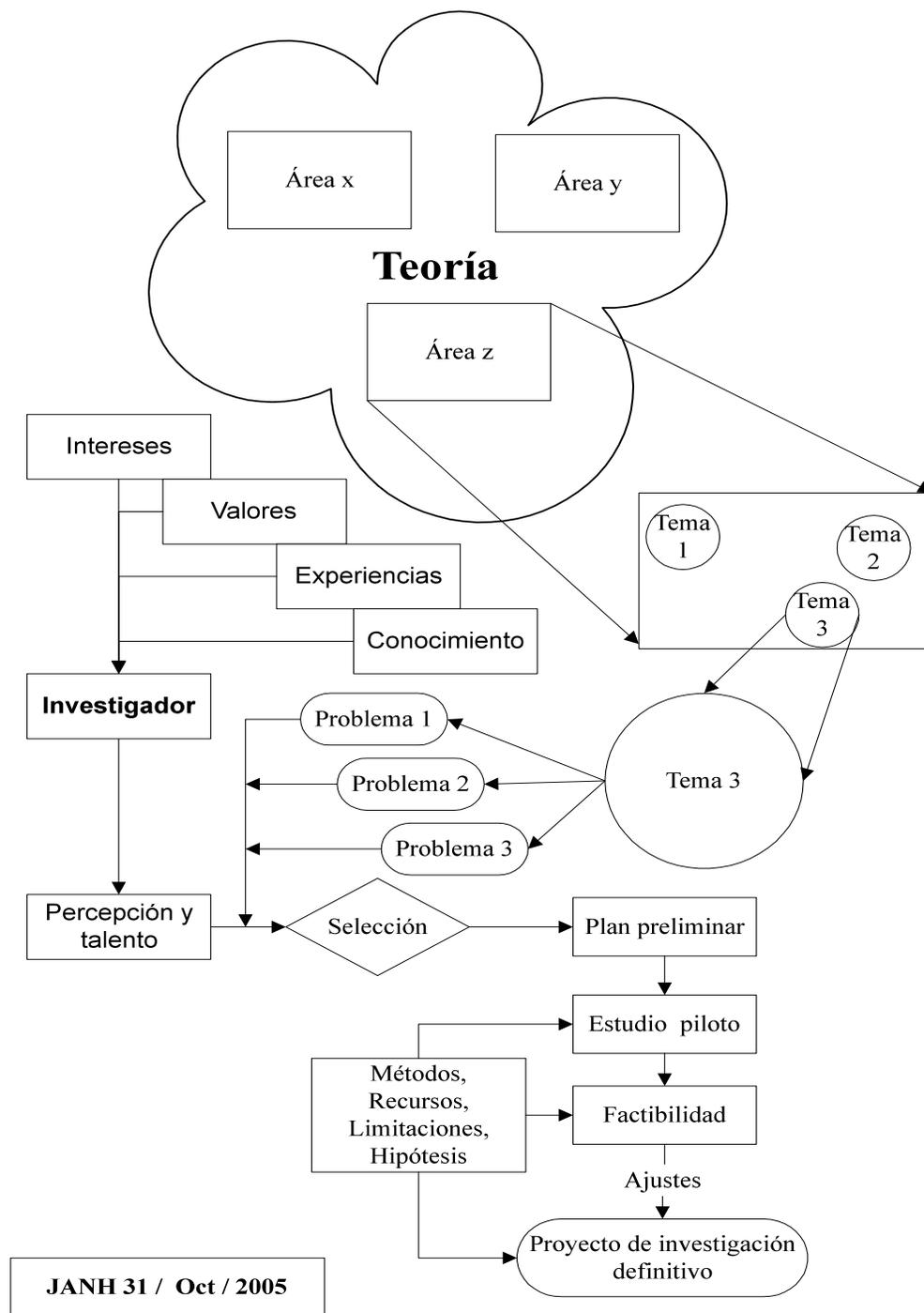


Figura 2. Modelo conceptual de las relaciones teóricas para la elaboración de un proyecto de investigación. Navarro HJA 2005

El problema es la guía para investigar el posible orden de los hechos y hallar la dificultad que debe resolverse. **El primer paso** de la búsqueda científica es formular el tópico en forma de problema. Para ello se requiere sensibilidad y talento personal **lo que permite** percibir los problemas y capacidad para formular problemas significativos. Los problemas de investigación son conflictos abstractos que se originan de las relaciones de causalidad entre los fenómenos naturales. **El primer aproximamiento** para descubrir un problema es la necesidad de resolverlo, sin la cual no se puede proceder. Plantear la pregunta es, de hecho, especificar el problema de investigación, elegirlo y priorizarlo como se muestra en la figura 3. Su planteamiento exige estudiar exhaustiva y sistemáticamente la literatura existente y discutir con otras personas que han acumulado mucha experiencia práctica en ese campo de estudio para determinar si el problema es el más apropiado de entre otros posibles sobre el mismo tópico, si existe controversia real, si es un conflicto original y novedoso, si es susceptible de resolver, y factible de realizar, con los recursos y la metodología disponible y propuesta, si se dispone de datos (o se pueden obtener) que conduzcan a su resolución, o si aporta valor práctico para el investigador y para la sociedad.

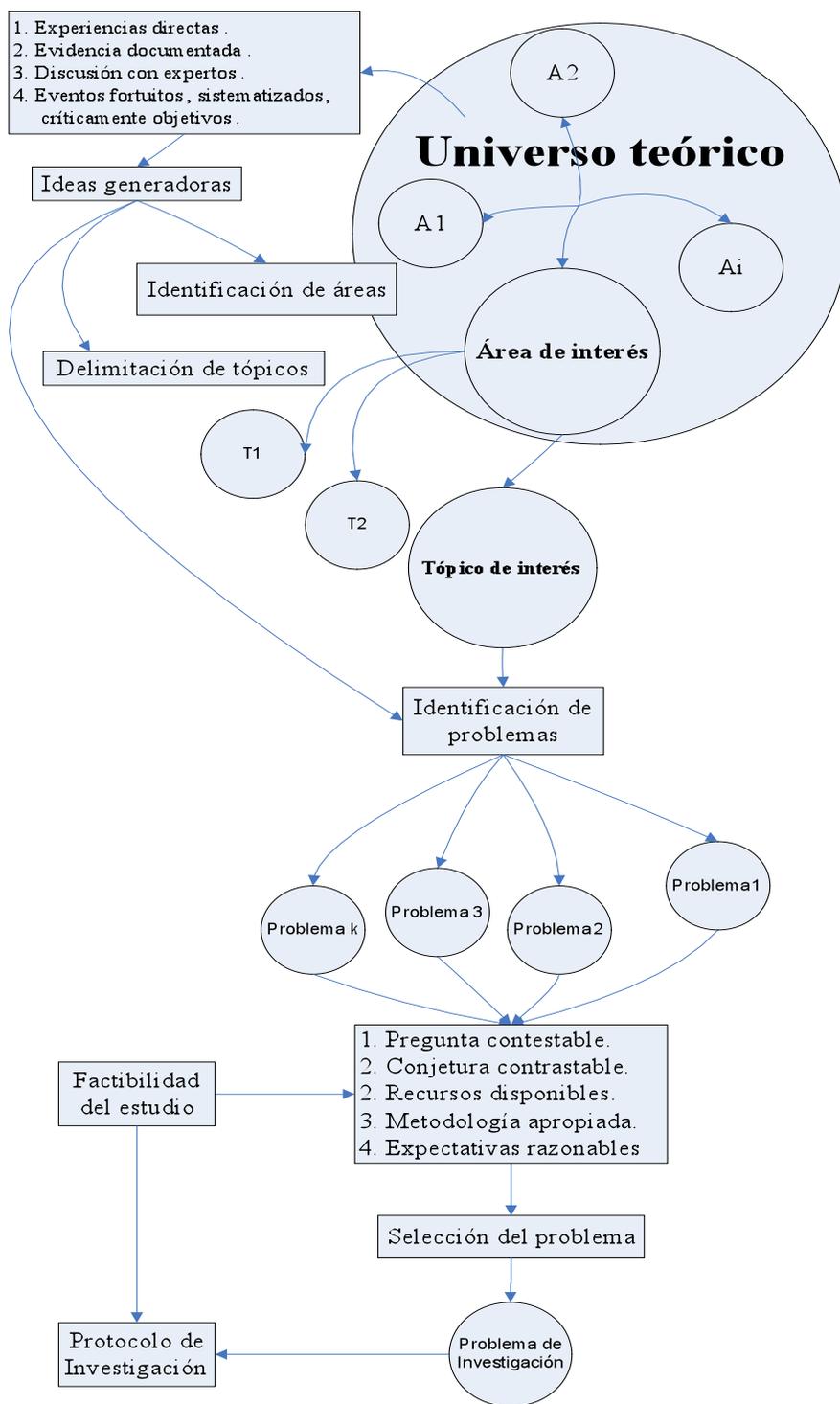


Figura 3. Modelo Conceptual del proceso de selección del problema de investigación.
 Navarro HJA, Ramírez ORA. 2010

La revisión sistemática y exhaustiva de los antecedentes permite determinar qué se sabe, se cree o se desconoce del problema. Éstos deben estar sustentados documentalmente y ser confiables y reproducibles. Por ello, deben analizarse crítica y objetivamente, para evitar distorsionar o sesgar los conceptos relevantes del problema. Esto requiere discriminar las publicaciones para obtener la información de calidad, específica, relacionada con el problema. Los antecedentes documentados son el marco teórico del problema de investigación y evitan duplicar esfuerzos y desperdiciar recursos; son indispensables para ajustar el modelo con el que se pretende resolver el problema (marco conceptual) y determinar su factibilidad.

2.2 Determinación de la Factibilidad del Estudio

La factibilidad del estudio es determinar la posibilidad real de llevarlo a cabo para investigar el problema dentro de los límites del modelo propuesto, con el plan y los recursos disponibles de un estudio único de tamaño manejable. Dicha factibilidad se debe determinar paralelamente al desarrollo del protocolo de investigación, con base en los siguientes elementos y preguntas auxiliares:

- **El problema.**
 - ¿Es investigable de la manera en que se formuló?

- **Los conceptos y los constructos.**
 - ¿Están claramente definidos?
 - ¿Se deben representar por evidencia empírica, obtenida a partir de observaciones directas o de actividades menores?
 - ¿Es factible realizar las observaciones y las actividades directamente?

- **Enfoque del problema.**
 - ¿Es demasiado grande?
 - ¿Es ambiguo?
 - Tipo de estudio ¿Se está estudiando efectos o relaciones, o es descriptivo?
 - ¿Tiene muchos conceptos no definibles?
 - ¿Tiene constructos no desagregables?
 - ¿Existen límites definidos de los conceptos, constructos y de las variables?
 - ¿Existen condiciones, razonablemente ingeniosas, analizables con las herramientas disponibles?, ¿las operaciones aplicables permiten investigar las relaciones buscadas?
 - ¿Están identificadas las variables más importantes del problema?

- **Tiempo.**
 - ¿El plan de ejecución de las operaciones y actividades se diseñó retrospectivamente a partir del problema?
 - ¿Se previeron contingencias?
 - ¿Se calcularon tolerancias para la ejecución de las operaciones y de sus etapas previas y subsecuentes?

- ¿Se calculó el tiempo para conseguir el tamaño apropiado de la muestra?
- ¿Se consideró el tiempo de aprendizaje para el uso de los instrumentos de medición y su validación?
- ¿Está considerado el tiempo de la fase piloto?
- ¿Cuánto tarda la fase de colección, organización, depuración, recaptura y análisis de los datos?
- ¿Cuánto tardará en escribir el reporte?
- **Financiamiento.**
 - ¿Es necesario retribuir la participación de sujetos de estudio?
 - ¿Es necesario comprar equipo de prueba, captura y análisis de datos?
 - ¿Con qué apoyo interno y externo se cuenta eficazmente?
 - ¿Se requiere amortizar los fondos de apoyo? ¿a qué plazo? ¿bajo qué condiciones?
- **Cooperación externa.**
 - ¿Requiere negociación con otros participantes?
 - ¿Exigen retribución? ¿de qué tipo? ¿de qué magnitud?
 - ¿Implica consecuencias éticas o legales?
 - ¿Las condiciones del estudio serán experimentales u observacionales?
 - ¿La participación externa implica relaciones sociales y manejo de conflictos?
- **Disponibilidad de sujetos de investigación.**
 - ¿Requieren condiciones contractuales?
 - ¿Existen impedimentos de naturaleza ética?
 - ¿Se evaluó el efecto del riesgo de su participación?
 - ¿Se requiere que posean características especiales?
- **Equipo.**
 - ¿Está disponible?
 - ¿Requiere innovaciones tecnológicas específicas?
- **Prevención de problemas.**
 - ¿Se tiene experiencia previa en el manejo de conflictos?, ¿son resolubles?
 - ¿Se tienen identificadas las fuentes potenciales de problemas?
 - ¿Se tiene un plan de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos?
- **Criterios de decisión para suspender, abandonar o revisar consecuencias.**
 - ¿Se tienen planes alternativos? ¿existen opciones razonables?

2.3 Protocolo de Investigación

¿Qué es el Protocolo?

Concepto: No existe una definición ideal, aunque se considera como:

- Declaración documentada de los procedimientos que se emplearán para investigar hipótesis relacionadas con el propósito de la investigación.
- Registro detallado de procedimientos y resultados de un experimento científico: es un procedimiento experimental.
- Declaración que incorpora información sobre los sujetos de estudio y cómo se distribuirán en los distintos tratamientos; debe describirse el método para realizar las mediciones y especificar cuándo se realizará cada una de ellas.⁽⁹⁾

El protocolo es un instrumento básico que permite pasar de la concepción de un problema a la ejecución de la investigación para resolverlo.

Es un documento de planeación estratégica, que obligadamente se debe construir antes de realizar una investigación, y se va desarrollando y mejorando a medida que el investigador concreta la idea y el diseño del estudio. Ayuda a refinar el planteamiento científico para resolver un problema y a hacer uso óptimo de los recursos de la investigación. Además, es imprescindible para someterlo a revisión técnica, para la crítica constructiva previa al inicio del estudio y para su aprobación por parte de los comités científicos de ética y especializados del área de estudio.

El protocolo refleja el pensamiento y orden mental concreto del investigador y es con el que pretende abordar el estudio de un fenómeno y resolver un problema.

El primer paso para pretender desarrollar un protocolo es identificar el problema que desea resolver. Posteriormente, se debe redactar una hipótesis genérica y precisar el objetivo del estudio en el contexto de un marco teórico concreto, lo cual requiere acompañarlo de una exhaustiva revisión de la literatura. Dicha revisión tiene como metas: aprender los métodos y estudios pertinentes aplicables a esa investigación, identificar los modelos animales apropiados y eliminar la innecesaria duplicación de experimentos; asimismo, permite matizar la idea original, precisar el objetivo del estudio, valorar los conocimientos actuales sobre el tema, los avances en la aplicación de los principios éticos de la investigación, evaluar la pertinencia y viabilidad del proyecto y proporcionar un marco conceptual para la investigación. También posibilita el obtener información sobre aspectos concretos del método, como son los criterios de selección, los instrumentos de medición y los procedimientos de análisis estadístico, entre otros. Se debe formular el objetivo específico del estudio, que es el eje en torno al cual gira el diseño del estudio y es la base para decidir los criterios de selección de los sujetos y las variables que han de ser medidas.

La siguiente fase es la elección del diseño básico, es decir del tipo de estudio más adecuado para responder a la pregunta; por lo que es necesario, identificar a la población blanco o diana, definir criterios de selección, estimar el tamaño de la muestra para así formar los grupos de estudio, en caso de que sea necesario.

También son fines del protocolo: especificar las variables y sus definiciones operativas, la técnica de medición que se utilizará y la fuente de información. Debe describir lo que le ocurrirá a cada sujeto que participe en el estudio (cómo se incluirá, qué seguimiento se hará, como recibirá la intervención, qué mediciones se realizarán, etc.) con suficiente detalle para que todos los miembros del equipo investigador conozcan lo que debe hacerse

en todo momento a lo largo del estudio. De igual forma, debe establecer qué información se registrará, quién y de qué forma lo hará y los mecanismos de control de calidad.

Es muy importante prever las posibles dificultades que pueden presentarse durante el estudio y especificar las soluciones que se proponen para evitar los sesgos; por ejemplo, técnicas para aumentar el grado de comparación de los grupos, estrategias para disminuir el número de no respuestas o de pérdidas de seguimiento y para recuperarlas si se producen, estrategias que aseguren que la calidad y la homogeneidad de los datos y la utilización de técnicas de cegamiento.

En el protocolo se debe plasmar, de manera clara, el plan de análisis de datos.

La realización de un cronograma es un aspecto clave; ya que intervienen otras personas o instituciones ajenas al propio equipo y se requiere asegurar su colaboración.

El éxito dependerá de lo bien que se haya diseñado y si se han identificado los posibles problemas antes de iniciarlo. Por esta razón, es conveniente realizar uno o varios estudios piloto que pongan de manifiesto los aspectos en los que hay que insistir o que deben mejorarse.⁽¹⁾

Los componentes del protocolo de investigación científica, dependen del tipo de estudio que se quiere realizar, el cual puede ser observacional o experimental. En todo protocolo no deben faltar los elementos cruciales, que son:

- 1) Formular la pregunta de investigación a través de la identificación, priorización, análisis y delimitación del problema.
- 2) Título del proyecto de investigación.
- 3) Construir el marco teórico del estudio a partir de la revisión crítica, sistemática y exhaustiva de los antecedentes del problema y justificar el estudio.
- 4) Formular los objetivos y la hipótesis de investigación.
- 5) Establecer la metodología para abordar el problema a través de:
 - a) Desarrollar el diseño de la investigación.
 - i) Declarar el tipo de estudio.
 - ii) Caracterizar las condiciones espaciales y temporales del estudio.
 - iii) Qué características tiene la población objetivo.
 - iv) Qué tamaño tendrá la muestra y cómo será seleccionada de la población objetivo.
 - v) Criterios de inclusión de los sujetos elegibles y criterios de eliminación de sujetos del estudio.
 - vi) Definir los criterios de formación de grupos y asignación de tratamientos.
 - vii) Consideraciones éticas y criterios de punto final del estudio.
 - b) Describir la metodología:
 - i) Describir métodos, procedimientos y uso de recursos instrumentales en el estudio.
 - ii) Desarrollo cronológico del estudio:
 - (1) Qué tipo de comparaciones se realizarán.
 - (2) Cómo se aplicarán las intervenciones y se controlarán los sesgos.
 - (3) Qué variables se medirán, con qué validez y precisión.
 - iii) Elaborar un plan de procesamiento y análisis de los resultados.
 - (1) Cómo serán capturados y almacenados los datos.
 - (2) Cómo serán analizados:

- (a) Obtención de medidas de resumen y descripción de resultados.
- (b) Determinación del tipo de análisis requerido: Cualitativo o cuantitativo.
 - (i) Análisis descriptivo inicial de resultados.
 - (ii) Inferencia estadística: Declaración del modelo estadístico asociado al diseño del estudio, criterios de selección del tipo de contraste y nivel de significación o criterio de rechazo de la hipótesis nula.

Generación de conclusiones: Interpretación de hallazgos.

Los elementos críticos para la construcción del Protocolo de investigación son:

- Limitaciones de tiempo y financiamiento.
- Apego a normas oficiales.
- Cumplimiento de especificaciones técnicas, propias de compañías de apoyo, como Buenas Prácticas de Laboratorio, manejo de residuos peligrosos, cronograma estricto, normas éticas y legales y diseño y estructura del documento.
- El diseño debe dar respuesta más al contenido del proyecto que al estilo o formato del documento.

2.4 La Pregunta de Investigación

La ciencia avanza por el surgimiento de nuevas preguntas a problemas antiguos o por el replanteamiento de preguntas antiguas por el avance del conocimiento. Así, *“la investigación se reconoce como el arte de hacer preguntas”*.⁽¹⁰⁾

Las razones de hacer preguntas en investigación son intelectuales, ya sean:

a) basadas en el deseo de saber o entender para satisfacción del conocimiento o el entendimiento (ciencia “pura”); y b) prácticas, basadas en el deseo de saber, para ser capaces de hacer algo mejor o más eficientemente (ciencia “aplicada”).

La investigación no da respuestas finales a las preguntas, sin embargo, existe el esfuerzo constante de diseñar y poner en práctica procedimientos que aumentan la probabilidad de dar respuestas de investigación más acertadas.

Las preguntas se enfocan a llenar lagunas de conocimiento, a demostrar o refutar conjeturas (hipótesis), o a comprobar si algunas creencias son, de hecho, sostenibles.

Para que la pregunta sea contestable, la investigación debe aportar información necesaria y apropiada derivada de la observación o la experimentación en el mundo natural.

Una pregunta se identifica con un problema de investigación o con algún aspecto del mismo: *¿porqué hay más casos de cáncer entre fumadores?, ¿Es necesario vacunar a los perros contra la rabia, cada año, para protegerlos de enfermar?*

El tipo de pregunta depende del problema que se investiga; puede surgir de observar eventos o series de eventos y puede cuestionar si tales eventos siguen un patrón o hay circunstancias que cambian el resultado. Asimismo, pretende explicar si ciertas condiciones conducen a resultados específicos: *“¿qué sucede cuando...?”, “¿qué pasaría si...?”, “¿qué procedimiento es más eficiente?”*.

Las preguntas de opción o de decisión involucran valores y no pueden ser contestadas sólo con la información. La respuesta depende no sólo de la información de los hechos, tal como la incidencia de una enfermedad o los recursos médicos, sino de la iniciativa y el

bienestar personal, y de las circunstancias del suceso. Las preguntas contestables sólo con la información pueden necesitar tiempo o tecnologías que aun no han sido desarrolladas para capturar datos relevantes. El hecho de disponer de un método o de los recursos necesarios para plantear la pregunta y coleccionar la información, no implica que la investigación resultará siempre en una respuesta a cada pregunta o, si se consigue una respuesta, que ésta sea definitiva.

El proceso de investigación implica actividades relacionadas entre sí que se traslapan o se ejecutan reiterativamente de manera pendular y no estrictamente lineales en secuencia progresiva. Así, el primer paso de un proyecto de investigación determina la naturaleza del último, y si los pasos subsecuentes no son tomados en cuenta, se tendrá dificultad en resolver los primeros y de completar el estudio, por lo que se debe prever las relaciones entre las etapas y cuidar las necesidades de los subsecuentes. Conforme progresa el proceso desde la concepción del tema de estudio, hacia la captura de datos, la producción del reporte y la aplicación de los hallazgos, la atención cambiará de una actividad a la siguiente. Esta alternación dependerá del énfasis de cada etapa, más que la concentración exclusiva en una de ellas.

- La pregunta de investigación debe reunir las siguientes características:
 - Debe plantearse de manera única.
 - Ser explícita, simple y sin componentes confusores.
 - Ser relevante y consistente.
 - Ser novedosa.
 - Ser viable.
 - Ser contrastable.
 - Ser ética.
 - Su enunciado debe definirla *a priori*

- El planteamiento correcto de la pregunta de investigación marca la pauta para identificar el problema de investigación.

3. DESARROLLO DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

3.1 Título del Proyecto

Un buen título debe ser corto, preciso y conciso. Debe contener y hacer claros, para el lector (revisor), tanto los objetivos centrales como las variables de estudio. El título aporta las palabras clave para la clasificación e indexación del proyecto. Si es posible no hacerlo largo, debe dar una idea preliminar de lo que consiste el protocolo. Es importante especificar qué población o universo será investigado. ⁽⁹⁾

3.2 Justificación del Proyecto

La investigación científica está orientada hacia la búsqueda de respuestas, pero puede o no encontrárselas, debido a que la investigación es un proceso iterativo, no terminal: “*Mientras que la ciencia antigua tenía la apariencia de algo completado, para la cual la noción de*

progreso no era esencial, la ciencia moderna progresa hacia el infinito".⁽¹¹⁾ La justificación para realizar un experimento en el que el modelo sea un animal, se centra en el beneficio potencial de la investigación, tanto para los humanos como para los animales, basada en tres aspectos que son:

- Declaración del problema de investigación
- Marco teórico (antecedentes)
- Argumentación de la necesidad de utilizar animales

3.2.1 Declaración del Problema

Esto constituye la justificación científica del estudio. La declaración se basa en la necesidad de investigar para generar nuevos conocimientos que contribuyan al conocimiento existente. La declaración debe escribirse en una forma que dé referencias empíricas que describan la situación y que también especifique claramente las lagunas en el conocimiento, la controversia y la evidencia no concluyente que existen en torno al problema. Además, puede haber evidencia muy concluyente de conocimientos que se consideran establecidos, pero el investigador cuestiona el conocimiento acumulado a causa de ciertos acontecimientos que tiene intención de someter a verificación. Es en este punto donde el investigador define el objeto de estudio y transmite las preguntas y cuestiones más amplias que motivan la investigación.

Una secuencia lógica de la declaración, que se conoce como *estado del arte* del problema, es la situación científica del problema conocida hasta la fecha y debe ser la siguiente:

- Magnitud, frecuencia y distribución. Áreas geográficas afectadas y población afectada por el problema. Considerar especie, raza y género.
- Causas probables del problema:
 - ¿Cuál es el conocimiento actual del problema y que lo ocasiona?
 - ¿Hay consenso?
 - ¿Hay controversia?
 - ¿Hay evidencia concluyente?
- Solución o soluciones posibles:
 - ¿De qué formas se ha intentado solucionar el problema?
 - ¿Qué se ha propuesto?
 - ¿Cuáles son los resultados de lo que se ha propuesto?
- Preguntas sin respuestas:
 - ¿Qué falta por ser respondido?
 - ¿Qué áreas no han sido posible entender, determinar, verificar o probar?

La declaración del problema debe brindar un *argumento convincente* de que no hay suficiente conocimiento disponible para explicar el problema y sus soluciones alternativas

posibles, o debe brindar un *argumento convincente* para la necesidad de probar qué se conoce y qué se toma como hecho, si se pone en duda por los nuevos descubrimientos.

La justificación también debe describir el tipo de conocimiento que se espera obtener y el destino de su aplicación. Debe indicar la estrategia de la divulgación y uso de los hallazgos de la investigación en función de los posibles usuarios del conocimiento generado. La justificación debe responder a lo siguiente:

- ¿Cómo se refiere la investigación a las prioridades de la región y el país?
- ¿Qué conocimiento e información será obtenido?
- ¿Cuál es la finalidad útil de los conocimientos obtenidos del estudio?
- ¿Cómo se divulgarán los resultados?
- ¿Cómo se utilizarán los resultados, y quiénes serán los beneficiarios?

La justificación forma parte de la declaración del problema, debe brindar un *argumento convincente* de que el conocimiento generado será útil y aplicable de manera general dentro del contexto de la región donde será realizado.

Lo anterior muestra que el investigador ha documentado el problema y que será necesario revisar exhaustivamente las fuentes de información acerca del tópico de estudio.⁽⁹⁾

3.2.2 Marco Teórico (Antecedentes)

Cuando se desarrolle el protocolo de investigación, es necesario determinar qué investigación previa está disponible acerca de la pregunta o el problema de investigación. Esto ayudará a hacer más claro el valor de la pregunta, así como también, qué se conoce o qué está probado acerca del tópico seleccionado. También aportará información sobre varios enfoques de investigación utilizados previamente y las fuentes que se pueden emplear como referencias.⁽¹⁶⁾

El marco teórico deriva de la declaración del problema de investigación (presentación de la evidencia empírica y de la pregunta central) y es la argumentación que demuestra que la pregunta de investigación tiene bases para plantear la hipótesis de trabajo y proponer posibles respuestas.

El marco teórico aporta dos elementos relevantes para la investigación, que son:

- Establecimiento de relaciones entre variables.
 - ¿Qué se conoce, y cómo ha sido explicado?
 - ¿Son concluyentes los resultados?
 - ¿Cuáles son las bases de la pregunta?
- Posibles respuestas a la pregunta explicada y defendida
 - ¿Cuáles son las suposiciones?
 - ¿Cuáles son las relaciones?
 - ¿Cuál es la hipótesis de trabajo?

El marco teórico son “los motivos” que apoyan a la pregunta central del estudio, declara el razonamiento y los argumentos para encontrar la evidencia que ofrecerá una respuesta a la pregunta y a la hipótesis.⁽⁹⁾

Cuando se evalúa la necesidad de emprender un proyecto en particular, la revisión crítica de los antecedentes es esencial. Existen estudios de la literatura biomédica que indican que más del 50% de las publicaciones tienen errores estadísticos obvios y en algunos casos las conclusiones no están apoyadas por los datos publicados. Tales documentos no deben ser aceptados porque también pueden inducir a que otro investigador seleccione estrategias y diseños inadecuados. ⁽¹⁷⁾

En una revisión de 133 publicaciones en el Australian Veterinary Journal, recomendada por el mismo journal, se estimó que 61% habría requerido la revisión estadística por un especialista del área, antes de su publicación. También se encontró que 30% tuvo deficiencias en el diseño, mala aleatorización, uso de material heterogéneo, inapropiado tamaño de la muestra y sesgo. En 45% hubo deficiencias en el análisis estadístico por el uso de métodos poco óptimos y errores en los cálculos. Finalmente, en 33% de los documentos, hubo errores en la presentación de los resultados por omisión inexplicable de datos y métodos estadísticos inapropiados. ⁽¹⁸⁾

Hacer la búsqueda detallada de literatura científica para determinar qué se conoce acerca del tema central del estudio. Ésta debe incluir libros, journals antiguos y actuales, así como información disponible en la internet. La búsqueda de revistas científicas periódicas (journals) se puede hacer en cualquiera de los índices o bases de datos de journals, como MEDLINE, TOXLINE, PUBMED, NCBI y AGRICOLA.

Las metas de la búsqueda de literatura son:

- Aprender sobre métodos pertinentes.
- Realizar diseños experimentales apropiados.
- Identificar los modelos animales convenientes.
- Eliminar la duplicación innecesaria de la investigación.

En esta etapa se deben considerar las 3R^{as} de la investigación con animales: Reducción del número de animales, Refinamiento de los métodos y Reemplazo de los animales por alternativas viables no animales cuando éstas existan. La búsqueda de la literatura también es un importante elemento para la revisión del protocolo de investigación por los **Comités Institucionales responsables** ya que aporta evidencia de que el proyecto no se está duplicando, que las alternativas al uso de animales no están disponibles y que los procedimientos potencialmente dolorosos están justificados. ⁽¹⁹⁾

3.2.2.1 Revisión Sistemática

Es uno de los recursos iniciales más importantes de un proyecto de investigación. La Revisión Sistemática reúne la evidencia necesaria para responder la pregunta de investigación concreta, valorando todas las pruebas disponibles. El primer paso consiste en definir con claridad y precisión dicha pregunta.

Una revisión sistemática, es una investigación que no se realiza sobre los datos primarios, es decir, no recoge la información directamente de los sujetos, sino que utiliza los datos reportados en estudios previos; consiste en la síntesis de la mejor evidencia científica disponible para responder a una pregunta concreta mediante la aplicación de una

metodología explícita y rigurosa. Esto se alcanza, utilizando la misma metodología que cualquier estudio de investigación.

- Se formula un objetivo.
- Se buscan, identifican y valoran las pruebas disponibles.
- Se obtienen conclusiones.
- Se interpretan resultados.⁽¹⁾

3.2.2.2 Necesidad de hacer Revisiones Sistemáticas

La premisa de que los modelos animales son, en general, predictivos de lo que suceda en los humanos, es la base para el amplio uso de los primeros en los ensayos de toxicidad, ensayos de seguridad y eficacia de agentes quimioterapéuticos y otras intervenciones clínicas realizadas en los segundos. Sin embargo, existen numerosos casos de discordancia entre los resultados de lo que sucede en humanos y animales de laboratorio y sugieren que esta premisa puede ser incorrecta, y que la utilidad de los experimentos con animales para estos propósitos no se puede garantizar. Por otro lado, sólo un pequeño número de experimentos se revisan normalmente en estudios de caso, y su selección puede estar sujeta a sesgos.

Para aportar conclusiones definitivas, es necesario hacer revisiones sistemáticas sobre la utilidad que tienen un gran número de experimentos realizados con animales en la ciencia biomédica. Los experimentos incluidos en esas revisiones, se seleccionan sin sesgos, a través de la aleatorización y por medidas metódicas e imparcialmente similares. Se han publicado un número creciente de esas revisiones y de meta-análisis, mismas que en conjunto aportan información relevante de la utilidad de los modelos animales en el campo de las ciencias biomédicas aplicadas a humanos y a los mismos animales.

Al menos 11 revisiones sistemáticas realizadas en un periodo comprendido entre los años 2001 y 2007, demostraron la pobre calidad metodológica de muchos de los experimentos con animales y también demostraron, que la mayor parte de ellos, tenían una calidad metodológica regular. Las deficiencias comunes fueron la falta de: cálculo del tamaño de la muestra, muestras insuficientes, modelos animales apropiados (particularmente por el uso de animales viejos o enfermos durante la investigación), asignación de tratamientos aleatorizados, administración cegada de los fármacos, inducción cegada de las lesiones, evaluación cegada de los resultados y declaraciones de los conflictos de interés. En algunos estudios se utilizaron anestésicos que pudieron alterar los resultados experimentales y fue evidente una variación sustancial de los parámetros evaluados.⁽²⁰⁾

3.2.3 Argumentación para Utilizar Animales en la Investigación, Enseñanza y Constatación

Al inicio de este siglo, fue claro, tanto para la sociedad como para la comunidad científica, que la ciencia, a menudo da origen a un número importante de cuestionamientos de índole ético, principalmente en las áreas de investigación, enseñanza y constatación con animales; cuyas preguntas se dirigen hacia la justificación de los estudios que involucran dolor y estrés; los cuales deterioran el bienestar animal.⁽¹¹⁾ El valor de la investigación con

animales para encontrar nuevos tratamientos para las enfermedades de los humanos y de los mismos animales, es un debate continuo. El punto inicial del debate debe ser el reconocimiento de las contribuciones de los experimentos con animales en el pasado, para nuestro entendimiento de las enfermedades y tratamientos existentes. Se puede citar el principal impacto de la investigación hecha con animales en enfermedades como poliomielitis, trasplante de órganos, como riñón, corazón, y en la enfermedad de Parkinson. Casi todas las formas convencionales de tratamientos médicos (incluyendo muchos fármacos, tratamientos quirúrgicos y vacunas) se desarrollaron con la ayuda de los animales involucrados en la investigación. Gran parte de lo que sabemos acerca del funcionamiento básico del cuerpo, tanto de animales como de humanos, ha llegado a nosotros a través de dos siglos de experimentos con animales. Cada década, la investigación con animales, trae conocimiento más nuevo y más profundo.⁽¹³⁾

De hecho, casi todos los avances médicos en el último siglo, se deben a la investigación con animales, ya que no es ético y es ilegal experimentar con humanos. Además de que aporta información necesaria para predecir cómo un nuevo fármaco o procedimiento puede afectar a un humano. Los médicos y los profesores de medicina quienes en la actualidad realizan cirugías delicadas en cerebro, corazón, pulmones, oído y ojo deben desarrollar las habilidades necesarias aprendiendo en los animales, antes de que los pacientes humanos y animales estén bajo su cuidado y responsabilidad. También es cierto que, ni los modelos de computadora, cultivos celulares, o sustancias artificiales pueden simular al tejido, músculo, sangre, huesos y órganos trabajando en conjunto en un sistema viviente. Si aboliéramos completamente, el uso de animales vivos, seríamos incapaces de investigar los efectos de cómo los sistemas corporales interactúan entre sí ante enfermedades y tratamientos. Los mismos métodos que han sido desarrollados para prevenir y tratar enfermedades en humanos, han mejorado la calidad de vida de un sin número de animales. Más de 80 medicamentos y vacunas desarrolladas para humanos, se utilizan en la actualidad para curar a animales de compañía, de granja y fauna silvestre y como resultado de la investigación con animales, viven más tiempo y tienen una vida más sana y confortable. El desarrollo de vacunas para animales, ha ayudado a combatir enfermedades como rabia, hepatitis infecciosa, gusano del corazón y moquillo (distemper) en perros, leucemia viral y rabia en gatos, tratamientos contra cólera en cerdos, técnicas preventivas contra tuberculosis en vacas e influenza y encefalitis en caballos. Además han ayudado con tratamientos para articulaciones artificiales en perros, protocolos para cáncer, enfermedades del corazón, antibióticos, para tratar deficiencia de vitaminas y minerales como en el raquitismo. Actualmente, las técnicas diagnósticas como el ultrasonido y la tomografía axial computarizada, se utilizan cada vez más en Medicina Veterinaria. La investigación con animales contribuye a la preservación de especies en peligro de extinción, como el Cóndor de California, los monos titíes de Brasil; en los que se han aplicado nuevas técnicas reproductivas. Ha contribuido significativamente a programas de inseminación artificial en especies como los elefantes, pandas y otras especies de vida libre amenazadas o en peligro de extinción.⁽¹⁴⁾

A continuación se enlistan, de manera breve, los avances médicos logrados a través de la investigación con animales y los animales a los que se da el crédito.

- 1726 La primera medición de la presión sanguínea. (Caballo)
- 1790 Desarrollo de la vacuna contra viruela. (Vaca)
- 1880 Desarrollo de la vacuna contra Ántrax. (Oveja)
- 1888 Desarrollo de la vacuna contra Rabia. (Conejo y Perro)
- 1902 Descubrimiento del ciclo de vida de la Malaria. (Paloma)
- 1905 Descubrimiento de la patogénesis de Tuberculosis. (Vaca y oveja)
- 1919 Descubrimiento de los mecanismos de inmunidad. (Cobayo, Caballo y Conejo)
- 1923 Descubrimiento de la insulina. (Perro y Pez)
- 1928 Descubrimiento de la patogénesis de la Tifus. (Cobayo, Rata y Ratón)
- 1929 Descubrimiento del apoyo de las vitaminas al desarrollo de los nervios. (Pollo)
- 1932 Descubrimiento del funcionamiento de las neuronas. (Perro y Gato)
- 1933 Desarrollo de la vacuna contra Tétanos. (Caballo)
- 1939 Desarrollo de anticoagulantes. (Gato)
- 1942 Descubrimiento del Factor Rh. (Mono)
- 1943 Descubrimiento de la Vitamina K. (Rata, Perro, polluelo y Ratón)
- 1945 Penicilina a prueba. (Ratón)
- 1954 Desarrollo de la vacuna contra Polio. (Ratón y Mono)
- 1956 Desarrollo del marcapasos y de cirugía a corazón abierto. (Perro)
- 1964 Descubrimiento de los mecanismos de regulación del colesterol. (Rata)
- 1968 Desarrollo de la vacuna contra la Rubéola. (Mono)
- 1970 Aprobación del Litio. (Rata y Cobayo)
- 1973 Descubrimiento de los patrones de comportamiento y sociales de los animales. (Abeja, Pez y Pájaro)
- 1982 Desarrollo del tratamiento contra la Lepra. (Armadillo)
- 1984 Desarrollo de anticuerpos monoclonales. (Ratón)
- 1989 Desarrollo de los avances en los trasplantes de órganos. (Perro, Oveja, Vaca y Cerdo)
- 1992 Desarrollo de las técnicas quirúrgicas por laparoscopías. (Cerdo)
- 1995 Desarrollo de la transferencia de genes para la fibrosis quística. (Ratón y Primates No Humanos)
- 2000 Descubrimiento de la transducción de señales cerebrales. (Ratón, Rata y Babosa de Mar)
- 2001 Desarrollo de drogas prometedoras para la prevención del SIDA. (Mono) ⁽¹⁵⁾

3.3 Objetivos de Investigación. (Generales y específicos)

Los objetivos de investigación necesitan ser claramente específicos y flexibles, con la definición de los puntos de decisión apropiados. Esto último ayudaría a un investigador a decidir si continúa con una línea particular de investigación o prueba con otra.

Para alcanzar los objetivos de la investigación, de manera correcta, se debe considerar la elección del modelo animal adecuado. Existe una amplia gama de cepas o líneas consanguíneas (inbred), exogámicas (outbred) mutantes, y transgénicas de ratas y ratones, que están disponibles, considerando que el resultado del proyecto puede depender,

críticamente, de la cepa o cepas utilizadas. Al elegirla se debe ser cuidadoso y se debe justificar en los términos de los propósitos de la investigación. La uniformidad de las cepas consanguíneas significa que, en muchos casos, se necesitan menos animales que cuando se usan cepas exogámicas, y la selección de la cepa consanguínea más apropiada, de las que están disponibles, puede llevar a reducir aún más el número de animales utilizados. Si el stock de cepas exogámicas había sido utilizado en el pasado, se debe considerar la posibilidad de cambiar a las consanguíneas, como una manera de mejoramiento de la ciencia, así como de la reducción del número de animales. Sin embargo, si son utilizadas las cepas consanguíneas o abiertas, los investigadores deben hacer el intento por justificar su elección.⁽¹⁷⁾

Los objetivos se deben definir después de que el marco teórico ha sido desarrollado y la secuencia es clara entre la pregunta central y las respuestas posibles a las preguntas e hipótesis de trabajo. Esto se recomienda dado que la definición de los objetivos es simplemente la operacionalización de las respuestas y la hipótesis formulada por el investigador, aunque se sabe que no toda la investigación requiere de la formulación de una hipótesis para su validación empírica subsecuente. Sin embargo, toda la investigación debe explicar sus objetivos generales y específicos. Son actividades intelectuales que el investigador desarrollará durante todo el proceso de investigación.

- Objetivo General.
 - Debe especificar qué tipo de conocimiento se espera obtener del estudio.
 - Debe dar una clara noción de que está descrito, determinado, identificado, comparado y en los casos de estudios con hipótesis de trabajo, confirmado.
- Objetivos específicos.
 - Son desagregados y emanan, lógicamente, del objetivo general. Son una vista preliminar del diseño de la investigación.⁽⁹⁾

Así, si los animales son utilizados en un proyecto de pobre calidad; el cual no hace una contribución significativa al conocimiento, o si el proyecto es realizado de una forma en la que falla para alcanzar sus objetivos científicos, se sabe entonces, que los animales han sido utilizados en vano. Esto sucederá también, en el caso en el que dichos objetivos no sean claros; por lo que no será fácil determinar si éstos han sido alcanzados en realidad.⁽¹⁷⁾

3.4 Formulación de Hipótesis.

Una vez definido el problema y establecido el plan del estudio, se propone una o más conjeturas o suposiciones (hipótesis) sobre los hechos que forman el problema (relaciones de causalidad). El papel de la(s) hipótesis en la investigación científica es sugerir explicaciones de los hechos que dan respuesta a la pregunta de investigación. “No se puede avanzar en la búsqueda de resultados si no se sugiere una explicación tentativa o una solución a la dificultad que la originó”.⁽²¹⁾

La explicación tentativa dirige la investigación al orden de los hechos. La sugerencia propuesta en la hipótesis puede ser la respuesta a la pregunta y la solución del problema, aunque no necesariamente conduce a ésta.

“Las hipótesis son declaraciones afirmativas sobre relaciones de causalidad entre objetos, situaciones, características o eventos de los fenómenos naturales, pero sujetas a contraste para su comprobación o refutación (falsación)”.

Asimismo, pueden postular que un evento ocurre con cierta frecuencia o proporción de veces, o que cierto suceso es más grande que otro o que una variable influye (determina) la ocurrencia de otra en circunstancias específicas. Las hipótesis deben declarar la relación específica propuesta del fenómeno que se estudia.

En resumen, previo a la realización de una investigación científica, se requiere de:

- Identificar el problema.
- Revisar los antecedentes y considerar los aspectos éticos y morales que conducirán a la justificación del estudio.
- Formular una o más hipótesis.
- Describir el abordaje del estudio a través de:
 - La declaración del diseño del estudio (observacional o experimental).
 - La ejecución del estudio.
 - El Plan de análisis de resultados y los contrastes de hipótesis implicados en el diseño.
- Concretar todas las ideas y plasmarlas en un protocolo.

Y posteriormente:

- Ejecutar el experimento.
- Discutir los resultados, formular conclusiones y darles difusión.

Debe tenerse en cuenta, que éstas etapas interactúan mutuamente y que no puede realizarse una de ellas sin que afecte a las demás, así, la definición del problema y la declaración de la hipótesis determinan en parte, tanto el diseño, como la ejecución del estudio. El diseño a su vez, tiene mucho que decir, sobre el método que se utilizará para recolectar los datos y la forma en la que serán analizados los resultados. Esto debe plasmarse en un protocolo de investigación, como se ejemplifica en la figura 4.

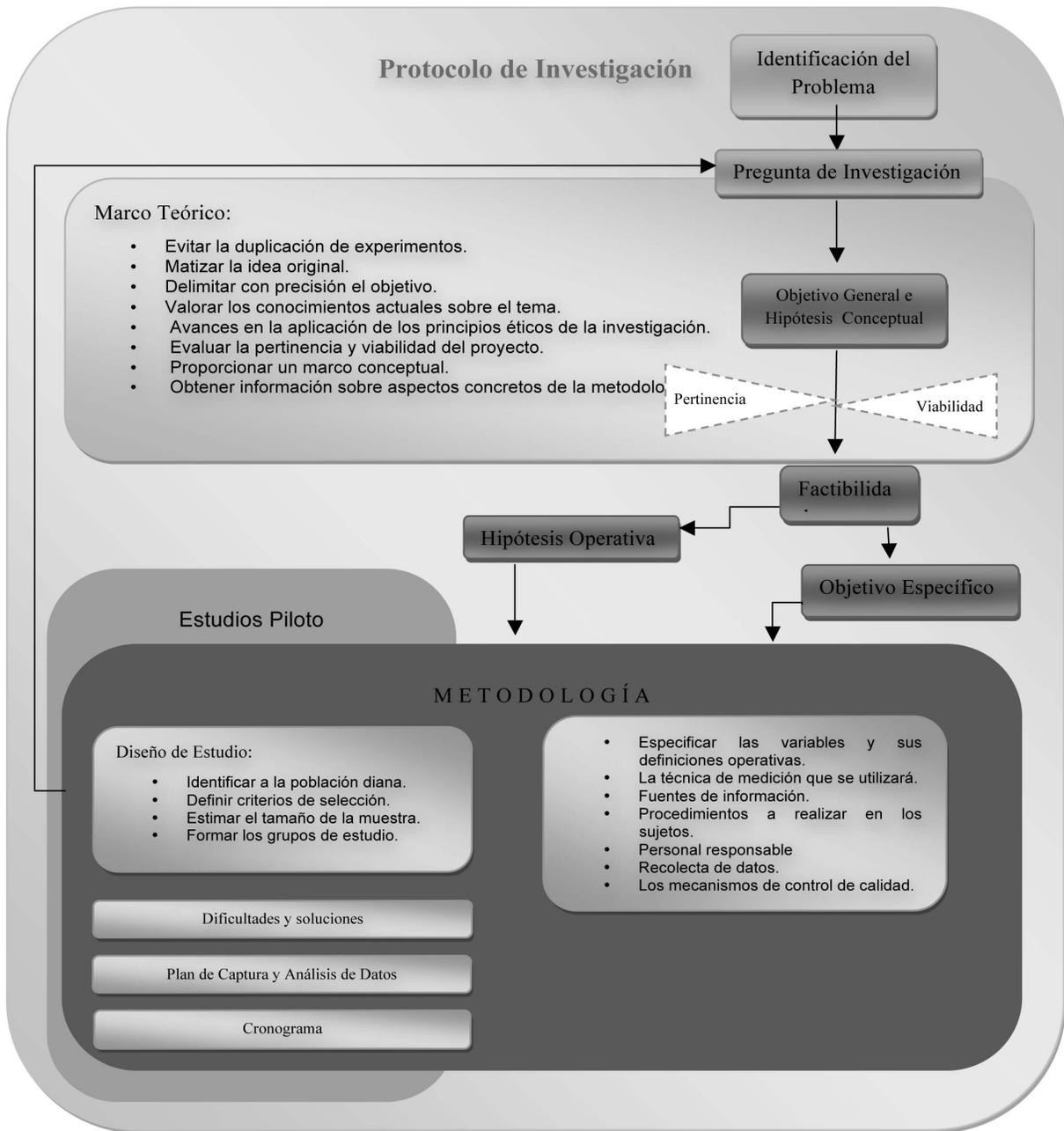


Figura 4. Modelo Conceptual de la estructura del Protocolo de investigación. Ramírez ORA, 2008.

4. CUMPLIMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS EN LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES.

Es imprescindible, que los investigadores usuarios de animales, conozcan la base ética que involucra la experimentación y el manejo de los mismos y que este conocimiento les permitirá cumplir adecuadamente sus objetivos. **Se debe** entender que el uso de animales vivos no es un derecho, sino un privilegio; con lo cual se obtendrá información que a su vez servirá para conformar el cuerpo de conocimiento del cual consiste la ciencia. Por lo tanto, es obligación de todos los que conforman el grupo de investigación, conocer y explorar acerca de los avances que se suscitan en ésta área de la investigación científica.

La investigación moderna de las ciencias biomédicas involucra la experimentación con animales vivos; la cual es considerada, como una herramienta importante para el progreso de la ciencia, la cual, en su mayor parte está directamente enfocada al descubrimiento de nuevas técnicas para prevenir, aliviar y curar enfermedades tanto del hombre como de los mismos animales.

Sin embargo, en general, los animales involucrados en los experimentos son alojados en jaulas con inadecuadas condiciones de espacio y de ambiente; por lo cual son afectados por el estrés o bien, son sometidos a intervenciones dolorosas y en muchas ocasiones mueren en condiciones no humanitarias.⁽²²⁾

La gran mayoría de estos animales son mamíferos que tienen un alto desarrollo de su sistema nervioso y no pueden, obviamente, dar su consentimiento para participar o no en la investigación; por lo cual, es un deber moral, tanto de los investigadores como de la sociedad en general, el asegurar el bienestar de los animales y el evitar al máximo el dolor innecesario de los mismos durante su utilización en los experimentos biomédicos.

Con la finalidad de normar el cuidado y uso de los animales en la experimentación es conveniente que cada institución, en donde se efectúan experimentos en los que se involucran este tipo de sujetos, cuente con un código de conducta ética. A continuación se presenta una propuesta basada en el código ético del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad del estado de Colorado, USA y de la Academia Suiza de Ciencias Médicas.

- Al ser dotado de razonamiento e inteligencia, el hombre es responsable de sus actos, en los cuales es deber buscar el bienestar de todos los seres vivos que lo acompañan. La vida enfrenta al hombre con problemas que debe resolver y de esta forma aumentar el rango y la amplitud de sus conocimientos. Al mismo tiempo, también es su deber respetar, preservar y cuidar a sus compañeros criaturas, los animales.
- Las investigaciones experimentales en animales tienen en general una importancia decisiva para la comprensión de fenómenos vitales. Representan una forma particular de la antigua práctica del hombre de utilizar animales para su propio bienestar y preservación. El conocimiento adquirido por la experimentación en animales le sirve al hombre en la protección de la vida, en el alivio del dolor y sufrimiento tanto de él como de los propios animales. El derecho reclamado por el hombre de utilizar a los animales es, de cualquier manera, inseparable de su obligación de evitar el abuso de este derecho.

- Cuando se utilizan animales vivos en la investigación, enseñanza y pruebas biológicas debe haber una expectativa razonable de que se va a contribuir al progreso del conocimiento, al mejoramiento de la salud humana o animal y/o al bienestar social.

El valor relativo de los estudios es de una consideración particularmente importante, sobre todo en experimentos potencialmente dolorosos en donde debe haber una supervisión estricta de las normas éticas del bienestar animal y en donde los beneficios de la investigación estén por encima de cualquier dolor, malestar o angustia que pudieran ser experimentados por los animales.

- Es bien conocido que en muchos protocolos de investigación simplemente no existe alternativa al uso de animales. A pesar de la imperativa social por la experimentación animal, todos los investigadores tienen la obligación ética de explorar alternativas por las cuales los animales puedan ser parcial o totalmente reemplazados por otros sistemas biológicos o matemático/computarizado. Cuando una pregunta de investigación puede ser contestada usando modelos no animales o con métodos *in vitro* razonablemente accesibles, los cuales permitan llegar a las mismas conclusiones científicas; el investigador debe elegir estas alternativas.

- La selección de un adecuado modelo animal es una consideración importante, en particular en el momento presente, en el cual se enfatiza el uso de modelos alternativos para la investigación. Es responsabilidad del investigador, por tanto, seleccionar la especie óptima para un proyecto en particular. Además el número de animales utilizados debe ser razonablemente minimizado y coherente con el conocimiento científico y los estándares estadísticos. Es también responsabilidad del investigador, considerar el origen del animal y garantizar que todos los animales utilizados con propósitos de experimentación sean adquiridos legalmente.

- Cuando los animales son usados en un experimento, el investigador tiene la obligación ética de buscar la técnica factible menos dolorosa que permita que los objetivos del proyecto se alcancen adecuadamente. Si el procedimiento está asociado con dolor, molestia o angustia, es imperativo que el investigador identifique la frecuencia, magnitud y duración del dolor, así como del malestar y la angustia consecuente, esto con la finalidad de planear adecuadamente el tratamiento del dolor.

- En procedimientos potencialmente dolorosos, el investigador debe de tomar todas las medidas necesarias para identificar y monitorear el dolor además del malestar y la angustia. En la identificación del dolor, el investigador utilizará los signos del comportamiento basados en el “patrón normal” de comportamiento de la(s) especie(s) bajo estudio. En algunas circunstancias se pueden utilizar algunos parámetros fisiológicos (v.gr. cortisol plasmático, catecolaminas, cuenta de linfocitos y parámetros cardiovasculares).

- Si un procedimiento causará más que un leve dolor o angustia al animal, estos deben ser minimizados tanto en intensidad como en duración a través de la administración de analgésicos, anestésicos y tranquilizantes apropiados. Esto debe ser ponderado de tal forma que el alivio aplique no solo en el momento en que se esté efectuando el procedimiento, sino también posterior a éste; es decir hasta el

momento en que el dolor haya sido aliviado o reducido a un nivel aceptable de tolerancia.

- En ningún caso es aceptable que un experimento potencialmente doloroso sea conducido en un animal conciente ni bajo la influencia de drogas paralizantes o curariformes, sin el uso concomitante de un anestésico apropiado.

- Está reconocido que en cierto tipo de investigaciones, la administración de anestésicos apropiados y/o analgésicos comprometerán la validación científica del experimento. Dichos experimentos deben ser plenamente justificados en términos del diseño científico y de su valor; y la eliminación de esas drogas deberá basarse en hechos científicos comprobados y no en simple intuición. Además, dolor, molestia y niveles de angustia deberán ser monitorizados cuidadosamente. Existe una limitante en el dolor al que un animal experimental puede ser expuesto.

- Los investigadores deben elegir el punto final del experimento lo más tempranamente posible en cuanto a su atención de minimizar el dolor y la angustia. Un animal en el que se observe un estado de dolor intenso el cual no pueda ser aliviado o reducido a un nivel de tolerancia aceptable, se debe aplicar la eutanasia inmediatamente.

- Ningún animal deberá ser sometido a múltiples cirugías en tanto se mantenga con vida, excepto cuando éstas estén interrelacionadas y sean esenciales para el objetivo primario de la investigación.

- Los procedimientos que involucren sujeción física se usarán en animales concientes sólo después de que hayan sido consideradas otras alternativas y se encuentre que éstas sean inadecuadas. Cuando se utilice un método de sujeción, el animal estar adaptado (condicionado) al dispositivo de sujeción, el cual deberá dar oportunidad al animal de tomar sus posturas normales. En general, animales concientes no deben ser sometidos a sujeciones físicas prolongadas.

- Es responsabilidad del investigador garantizar que los cuidados necesarios post-quirúrgicos sean proporcionados a los animales que lo necesiten. Estos cuidados deben ceñirse a los estándares internacionales y deberán otorgarse tanto como se requieran, incluso en horas no hábiles.^(23,24)

- La eutanasia es el acto de inducir la muerte sin dolor. El método propuesto de eutanasia debe apegarse a las recomendaciones de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) Panel on Euthanasia. Cuando un animal no será sujeto de eutanasia al finalizar el experimento, es responsabilidad del investigador, asegurar la correcta disposición final del animal.⁽²⁵⁾

- Los procedimientos que involucren el uso de animales deberán ser realizados por o bajo la supervisión inmediata de un individuo con el perfil profesional adecuado y que cuente con la experiencia necesaria relativa al proceso experimental.

- Los experimentos con animales son éticamente legítimos si forman parte de la *currícula* de facultades y escuelas de alto aprendizaje para estudiantes de medicina, medicina veterinaria, odontología, química y biología, y en el entrenamiento de técnicos de laboratorio y personal paramédico, en el entendido de que no existen, para la adquisición de los conocimientos, opciones alternas que permitan obtener esos conocimientos.

- Los experimentos en animales no son éticamente legítimos si existen métodos alternos suficientemente concluyentes para adquirir el conocimiento buscado. Los experimentos en animales que ya han sido adecuadamente realizados no deben ser repetidos sin una plena justificación.^(23,24)

Del conjunto de argumentos, generalmente aportados por los investigadores en el campo médico, se desprende que la experimentación animal es un “*mal necesario*”, “*un sufrimiento que hay que infligir si lo que se desea es disminuir el dolor humano*”.

Sin embargo, en general, los investigadores no ignoran el problema ético que plantea el dolor infligido a los animales. Si por una parte, atacan violentamente a los antiviviseccionistas extremistas, es frecuente que denuncien los abusos o actos de crueldad inútiles que algunos de sus colegas efectúan en los animales. Así, publican que trabajan tan sólo con animales sanos, adquiridos de criadores honestos, disponen para ellos de alojamiento adecuado y confortable, los manejan siempre de forma adecuada, utilizan siempre productos analgésicos y anestésicos para disminuir o suprimir el dolor y recurren, cuando es posible, a técnicas alternativas que permiten una reducción de la cantidad de animales necesarios para sus experimentos.

La conclusión de esta argumentación es que la medicina y la investigación biomédica actual difícilmente pueden prescindir de la experimentación animal. Los argumentos de carácter ético expuestos por los investigadores acerca de las modalidades de sus experimentos con animales son, sin embargo, cada vez menos convincentes, y es legítimo plantearse la cuestión del control de las reglas éticas que deben regir en las instituciones que efectúan experimentación con animales.^(26, 27)

A este respecto los filósofos prefieren teorías que sean consistentes, coherentes y obtenidas lógicamente. Los eticistas creen que los principios morales deben ser imparciales y no deben basarse en preferencias personales, sentimientos o prejuicios.

Además, el estatus moral de un individuo se basa en factores moralmente relevantes más que en criterios arbitrarios o moralmente irrelevantes; a este respecto se argumenta sobre qué factores son relevantes, por ejemplo el hecho de que los animales sean capaces de sufrir es relevante sobre la capacidad de razonar de los mismos o sobre si un animal es bonito o feo.⁽²⁸⁾

4.1 El Reemplazo de los Animales en los Experimentos, Reducción del Número y Refinamiento de la Técnica

En octubre de 1959 el mayor Charles Hume, cofundador de Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) presentó una ponencia en la 10ª Reunión Anual del Panel de Manejo Animal en Washington D.C., en la cual reportó a la UFAW cambios en la dirección y manejo de la producción de animales de laboratorio, hacia el control adecuado de las técnicas experimentales.

Así se refirió a la designación en el año de 1954 de William Russell, a quien él describió como un joven y brillante zoólogo, quien resultó también psicólogo y académico y de Rex Burch un brillante microbiólogo, quienes se encargarían de un estudio sistemático de las técnicas de laboratorio en cuanto a sus aspectos éticos.

Esto llevó a la publicación en 1959 de el libro “The principles of Humane Experimental Technique” en donde se establecen por primera vez las técnicas de reemplazo, reducción y refinamiento, comúnmente conocidas como las 3R’s. Actualmente las 3R’s son ampliamente conocidas por todos los investigadores responsables y no hay discusión sobre el bienestar de los animales de laboratorio que no se refiera al término. El libro de Russell y Burch, originalmente publicado por Methuen and Co. Ltd. London y reimpresso en 1960 por Charles C. Thomas, Springfield, Illinois USA. Ha sido reeditado por UFAW (1992), como una edición especial en homenaje póstumo a Charles Hume y como un gran tributo a William Russell y Rex Burch.⁽²⁹⁾

En su libro ellos definieron las alternativas como:

- **Reducción.** Se refiere a métodos para obtener niveles comparables de información a partir del uso de menos animales en los procedimientos científicos o bien para obtener mayor información con el mismo número de animales.

Un ejemplo de un reciente progreso en este campo es el del caso de ensayos de toxicidad aguda, muchos toxicólogos han demostrado que no es necesario el uso de 60 a 200 roedores para generar la dosis letal estadísticamente precisa, sino que ésta puede ser perfectamente obtenida usando no más de 10 a 20 animales.

Otro espectacular ejemplo de reducción en el uso de animales es el del programa de investigación de nuevas drogas de los Institutos Nacionales de Cáncer (NCI) USA. Los cuales han reportado durante algunos años el uso de más de 4.5 millones de roedores al año, utilizados para estudiar la actividad antitumoral de nuevas drogas. En la actualidad y después de muchos debates los NCI cambiaron los estudios en animales por el uso de cultivos celulares de líneas tumorales humanas (reemplazo), con lo cual se redujo la cantidad de animales utilizados al año aproximadamente 500,000 a 1,000.000, lo que representa una reducción aproximada del 80 al 90%.

- **Refinamiento.** Es el aspecto más descuidado del concepto de alternativas y se refiere a modificaciones en las técnicas para reducir el dolor y el estrés experimentado por los animales de experimentación. Por ejemplo, se han desarrollado varios tipos de cubiertas para proteger los catéteres insertados en los animales lo que permite a los investigadores administrar dosis continuas de fármacos y asimismo tomar muestras sanguíneas sin tener que contener y puncionar cada vez al animal, tomando en cuenta que estos procedimientos significan estrés para el animal, así el desarrollo de estas cubiertas constituyen un verdadero procedimiento de refinamiento.

- **Reemplazo.** Se refiere a la situación en la cual las técnicas que utilizan animales pueden ser sustituidas por técnicas de laboratorio o de otro tipo. Existen un buen número de ejemplos en los cuales se ha efectuado este reemplazo, ya sea para el diagnóstico de enfermedades o bien en la constatación y estandarización de agentes terapéuticos. De esta forma los conejos ya no se utilizan para pruebas de gestación; el uso de ratones en los ensayos de potencia de lotes de vacuna contra la fiebre amarilla ha sido reemplazado por ensayos utilizando cultivos celulares; también se ha eliminado totalmente el uso de ratones en las pruebas de estandarización de la hormona insulina.

4.2 Controles Legales y Justificaciones Éticas y Científicas

- Todos los países deben contar con una estructura legal que incorpore activamente las 3R's en toda investigación, constatación de biológicos y prácticas educativas en las que se ocupen animales de laboratorio.
- Deben implementarse mecanismos tanto formales como informales para la educación y entrenamiento de todos los científicos y funcionarios involucrados en cualquier procedimiento de la experimentación animal, para asegurar el cumplimiento del espíritu y letra de la legislación, normas, directrices y regulaciones que protegen a los animales de laboratorio.
- Cualquier experimento propuesto, debe ser sujeto a una revisión previa de parte de revisores expertos e independientes, tomando en cuenta consideraciones científicas y de bienestar animal.
- En esta evaluación debe reconocerse la importancia de los probables beneficios y sufrimientos de los animales involucrados en el programa de trabajo propuesto, de lo cual puede depender la aprobación para proseguir el trabajo.
- Debe haber un acuerdo internacional acerca de los niveles de sufrimiento a que un animal puede ser sometido, el cual debe de evitarse al máximo a pesar de cualquier beneficio potencial.

4.3 Premisas para Alternativas de Reducción

- En el caso en que sea posible seleccionar entre especies animales para la experimentación existe una justificación, no científica, para utilizar más animales de especies pequeñas que de especies grandes.
- El diseño de procedimientos y técnicas de laboratorio para ensayos, incluyen el requerimiento de muestras pequeñas, lo cual debe ser revisado regularmente, como parte de un proceso continuo y armonioso.
- Todo el personal científico, investigadores y tesis, involucrados en la investigación deben tener un adecuado entrenamiento y conocimiento en todo lo concerniente al diseño experimental y al uso de métodos estadísticos generales y específicos.

4.4 Premisas para Alternativas de Refinamiento

- Comprenden los métodos para aliviar y minimizar el potencial dolor y distres y que de alguna forma mejore el bienestar animal. El dolor resulta de un real o potencial daño a tejidos, como el causado por heridas, cirugías o enfermedad, los cuales conducen a estrés.
- El estrés es un estado adverso; en el cual los animales son incapaces de adaptarse adecuadamente a los agentes estresantes. El sufrimiento es un término genérico utilizado para definir las experiencias de dolor, estrés y/o daño duradero.
- Debe haber directrices internacionales que permitan categorizar el dolor y estrés animal, así como el de otros efectos adversos, incluyendo uniformidad en los

signos fisiológicos y conductuales que permitan reconocer estos efectos adversos y poder medirlos.

- Los individuos y las instituciones deben ser responsables, junto con sus autoridades nacionales, en la prospectiva y retrospectiva valoración de la naturaleza y los niveles de los posibles efectos adversos que la experimentación pueda ocasionar a los animales utilizados en cada programa de trabajo.
- La investigación sobre el refinamiento y el bienestar animal debe ser fomentada y financiada, incluyendo estudios de los efectos de los procedimientos propuestos para minimizar el dolor y el estrés, así como de la calidad de los datos obtenidos.

4.5 Premisas para Alternativas de Reemplazo

- La variedad de alternativas de reemplazo incluyen:
 1. Mejorar la captura, análisis, intercambio y uso de la información obtenida de la experimentación, para así evitar las repeticiones innecesarias.
 2. El uso de técnicas físicas y químicas que permitan hacer predicciones basadas en las propiedades fisicoquímicas de las sustancias a probarse.
 3. El uso de modelos matemáticos y computacionales, incluyendo los de las relaciones entre estructura y actividad de las drogas, modelos bioquímicos, farmacológicos y toxicológicos.
 4. El uso de organismos inferiores con sensibilidad limitada (por ejemplo animales invertebrados, plantas y microorganismos).
 5. El uso de métodos *in vitro*, incluyendo el mantenimiento a corto plazo de órganos perfundidos, cortes de tejidos y cultivos celulares.
 6. Estudios en humanos, incluyendo estudios epidemiológicos, vigilancia de productos, siempre tomando en cuenta las normas éticas de la experimentación con humanos.
- En el caso de la eficacia regulatoria de los ensayos de seguridad y toxicidad que permitan validar procedimientos para reemplazar a los animales de experimentación, ésta debe ser fomentada y financiada adecuadamente.
 - Idealmente, el desarrollo de los métodos de alternativas de reemplazo deben basarse en el conocimiento profundo de los mecanismos moleculares y celulares del fenómeno a ser medido y estudiado.
 - Puesto que es probable que en muchas circunstancias una prueba en un animal no podría reemplazarse por un solo método alternativo, el desarrollo, evaluación y optimización de variadas alternativas debe ser fomentado.

4.6 Educación y Entrenamiento

- Debe efectuarse una clara distinción entre la educación, propuesta para contribuir a la adquisición y desarrollo de actitudes apropiadas con respecto al uso de los animales y sus alternativas y el entrenamiento, que se propone para contribuir

al adecuado cuidado y manejo de los animales y a garantizar que los experimentos sean de la mejor calidad.

- Las autoridades responsables deben requerir, a todos los trabajadores involucrados en la experimentación con animales, el acreditar cursos con énfasis en el conocimiento de las **3R's** y en las obligaciones legales para, hasta donde sea posible, utilizar alternativas de reemplazo.

- Los estudiantes de colegios y universidades no deben ser forzados a efectuar procedimientos con animales y por lo cual se les debe proveer de opciones alternativas.⁽³⁰⁻³³⁾

5. LA CORRECTA SELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL

La mayor parte de la investigación biomédica es dirigida al conocimiento de la fisiología humana y animal a través del conocimiento de eventos celulares y moleculares que permitan explicar los fenómenos que ocurren durante la salud y enfermedad. Considerando que algunas características del organismo humano son compartidas por algunas otras especies, principalmente los primates, el uso de animales para desentrañar los puntos finos de dichas características ha sido de gran ayuda en la investigación biomédica, lo cual ha permitido, además del conocimiento claro de los procesos patológicos tanto de humanos como de los mismos animales, el desarrollo de nuevos medicamentos y procedimientos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades en ambos ^(34, 35)

El significado y validez con respecto a la utilidad en términos de “extrapolabilidad” de resultados generados en un modelo animal depende de la selección de un apropiado modelo animal. Un buen conocimiento de la anatomía y fisiología comparadas es una ventaja obvia para desarrollar un correcto modelo animal. Los modelos animales pueden ser encontrados de forma natural en el reino animal y el conocimiento acerca de la fisiología humana ha sido alcanzado en especies lejanas del humano en términos del desarrollo evolutivo. Un buen ejemplo de esto es la importancia de la mosca de la fruta para estudios originales de bases genéticas. Los modelos animales son utilizados, virtualmente, en todos los campos de la investigación biomédica. Prácticamente todo el conocimiento científico y los tratamientos de enfermedades desarrollados durante el último siglo han involucrado el trabajo con animales de laboratorio. Sólo en los pasados 50 años se efectuaron en medicina notables avances, como es el desarrollo de la vacuna contra polio, descubrimiento de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como la neumonía y drogas para el tratamiento de desordenes crónicos como hipertensión y úlceras diabéticas. En la actualidad se han hecho progresos en el tratamiento de enfermedades como la malaria, algunos tipos de Cáncer, Fibrosis quística, SIDA, Parkinson y enfermedad de Alzheimer, entre otras.⁽³⁴⁻³⁶⁾

El rápido incremento en el conocimiento médico después de 1800 puede ser atribuido en gran parte al incremento en el uso de los animales de laboratorio. Los científicos reconocen que esto dio una pequeña esperanza de replicar el daño que se presentaba en humanos, hasta la primera comprensión de cómo funcionan los sistemas vivos cuando están sanos. Durante el primer cuarto de los 1900's, los estudios con animales fueron cruciales para la obtención al menos de una tercera parte de los avances médicos. Poco después la experimentación animal posibilitó la obtención de la mitad de los descubrimientos médicos

significativos y durante algunos períodos representó hasta el 75% de los avances más importantes, tal como el descubrimiento de la insulina en 1920 (investigación en donde se utilizaron perros), el desarrollo de la vacuna de polio desarrollada en los años 50's (en donde se involucró a monos) y la prevención del sarampión durante los 70's (investigación en donde se utilizaron monos). Baste decir que dos terceras partes de los premios Nobel de Fisiología y Medicina otorgados desde 1901 han sido por descubrimientos en donde se han utilizado animales de laboratorio.⁽³⁴⁾

El incremento del uso de animales en investigación, constatación de biológicos y la enseñanza durante el siglo XX fue seguido del surgimiento de movimientos antiviviseccionistas (AV), los cuales tienen su origen en la Inglaterra Victoriana durante la última parte de los 1800's. El movimiento británico (AV) tuvo orígenes y objetivos diferentes de aquéllos de las asociaciones de bienestar animal o anticrueldad animal. Los AV fueron motivados por un miedo a la ciencia y repugnancia hacia la experimentación con animales, y probablemente por fuertes sentimientos misantrópicos. Así, los actuales movimientos de la defensa de los derechos de los animales tuvieron su origen en el movimiento Victoriano. Los nuevos movimientos antiviviseccionistas tienen los mismos objetivos y usan los mismos argumentos y tácticas que sus predecesores de 1900's para convencer al gran público de que su causa es correcta.^(34,35)

Sin embargo no existen reales sustitutos del uso de animales de laboratorio. Los estudios con bacterias, cultivo de tejidos y diseños computacionales pueden proveer información útil, pero la complejidad de los organismos vivos requiere investigar y probar en animales que tengan fisiología similar con los humanos para alcanzar resultados seguros y efectivos. La ceguera no puede ser estudiada en bacterias o la hipertensión en cultivo de tejidos. La cirugía no puede ser simulada en computadoras. Los efectos imprevistos o inadecuados de sustancias, las pruebas de nuevas drogas o materiales biomédicos deben ser probados en animales.⁽³⁴⁾

Los investigadores continuamente identifican o desarrollan nuevos modelos animales para evaluar mecanismos patógenos y procedimientos diagnósticos y terapéuticos, enfermedades nutricionales y metabólicas, así como la eficacia y desarrollo de nuevas drogas. Los modelos animales para agricultura y producción de alimentos también contribuyen con datos que permiten estudiar el envejecimiento y procesos degenerativos en humanos y animales.^(34,36)

5.1 El Concepto de Modelo Animal

Etimológicamente, la palabra “animal” deriva del latín *anima* que significa alma o espíritu, de esta forma se describe a organismos vivos que están animados.

5.2 ¿Qué es un Modelo Animal?

Un modelo es un objeto de imitación, más o menos fiel o semejante a otro, una persona o cosa que es similar en imagen de otra. La Biblia menciona que Dios hizo al hombre a su imagen y semejanza, esto es, hizo un modelo de sí mismo. Consecuentemente, se combinan las dos definiciones de “modelo animal” y se dice “es un objeto animado de imitación, una

“imagen del hombre” o de otras especies usado para investigar una circunstancia fisiológica o patológica en cuestión”^(34,36).

“Un organismo modelo es una especie animal que se estudia de forma exhaustiva en el laboratorio para comprender un fenómeno biológico concreto con el objetivo de que los hallazgos en esta especie sirvan para explicar como funciona este mismo proceso en otros seres vivos”⁽³⁶⁾.

El U.S. National Research Committee on Animal Models for Research on Aging intenta definir el término “modelo animal de laboratorio” como “un modelo animal en el cual la normalidad biológica y de comportamiento puede ser estudiadas, o en el cual se pueden investigar procesos patológicos espontáneos o inducidos y en los cuales el fenómeno en uno o más aspectos se asemeja al humano o a otros animales”.

Dentro de los modelos animales, el ratón es el mamífero más conocido, caracterizado genéticamente y por lo tanto el mayormente utilizado. Para muchos investigadores constituye un modelo idóneo, debido a que se conoce perfectamente su genoma, debido a su tamaño es fácilmente manejable, es de fácil y económico mantenimiento y además tiene un corto período gestacional, camadas grandes y alcanza la madurez sexual muy pronto por lo cual se tienen en poco tiempo varias generaciones. Es una especie que cuenta con muchas cepas tanto consanguíneas como no consanguíneas de forma tal que existen una gran cantidad de modelos a partir de esta disponibilidad.⁽³⁷⁾

Las cepas endogámicas, consanguíneas (inbred strain) son obtenidas mediante la cruce durante por lo menos 20 generaciones de animales en un sistema cerrado hermano x hermana (b x s) o progenitor x cría, de estas cruces se obtienen animales genéticamente definidos y estandarizados. Después de 20 generaciones, un promedio de 98.6% de los loci en cada ratón son homocigotos. Muchas cepas han sido cruzadas por aproximadamente 150 generaciones y se puede decir que en estas todos los loci son homocigotos. Cada cepa consanguínea es también coisogénica (genéticamente idéntica) debido a que todos los individuos tienen un mismo antecesor común.

En general estos animales se caracterizan por ser coisogénicos, tener un perfil genético propio, ser genéticamente estables por largos períodos de tiempo, fenotípicamente uniformes, responden de forma uniforme a los estímulos físicos, químicos y biológicos y son de distribución mundial. Su homogeneidad genética posibilita que en la respuesta a los estímulos, la información contenida en los genes no se considere una variable de importancia.

Las cepas exogámicas (outbred strain) son ampliamente utilizadas en la investigación biomédica, docencia y constatación de productos biológicos (principalmente vacunas). Son obtenidos por cruzamientos al azar (se debe evitar seleccionar cualquier característica que presenten), a partir de una gran cantidad de progenitores, lo que hace que tengan una gran variabilidad genética. Estos animales representan adecuadamente a la población humana, por lo cual son muy utilizados para probar vacunas, en estudios toxicológicos y estudios farmacológicos en general.

Debido a que no se encuentran genéticamente definidos, su uso se hace cada vez más cuestionable. Se recomienda sustituirlos por animales obtenidos de cruces entre cepas consanguíneas y/o por híbridos F1 de cepas o líneas distantes, los cuales presentan un polimorfismo alto, cercano a la población humana.⁽³⁸⁾

5.3 Clasificación de Modelos Animales

Una gran cantidad de modelos animales se han utilizado en el desarrollo de estudios de la estructura y función biológica en humanos. El modelo puede ser exploratorio, dirigido al conocimiento de mecanismos biológicos, **si es un mecanismo operativo y fundamental en la biología normal o un mecanismo asociado con una función biológica anormal.** Los modelos pueden también ser desarrollados y aplicados para los llamados modelos explicativos, **dirigidos al conocimiento de problemas biológicos más o menos complejos.** Un tercer e importante grupo de modelos animales es empleado como modelos predictivos. **Estos modelos son utilizados con el propósito de descubrir y cuantificar el impacto de un tratamiento, si éste cura una enfermedad o para evaluar la toxicidad de un compuesto químico.** ^(39,40)

La anatomía o morfología de la estructura del modelo de relevancia para los estudios puede ser de importancia en los tres sistemas modelos descritos. La magnitud de la semejanza de la estructura biológica en el animal con las correspondientes estructuras en el humano, ha sido llamada fidelidad. Un modelo altamente fiel con estrecha semejanza al caso humano puede tener obvias ventajas cuando se desarrollan determinados modelos. ^(34,37)

A menudo, lo más importante, es la capacidad discriminativa del modelo, en particular los modelos predictivos. Por ejemplo, cuando se usan modelos para evaluar la carcinogenicidad de una sustancia, es esencial que cuando menos una de las especies “modelo animal” seleccionadas, responda de una manera predictiva similar a la respuesta humana a la aplicación de la misma sustancia. ⁽³⁴⁾

De esta manera la similitud entre los humanos y las especies modelo con respecto a los mecanismos biológicos relevantes es a menudo lo más importante dentro de la fidelidad de un modelo, lo cual otorga la oportunidad idónea para estudiar una función biológica particular.

Un modelo animal puede ser considerado homólogo si los síntomas mostrados por el animal y el curso y condición del proceso son idénticos a los de los humanos u otros animales. Los modelos que satisfacen estos requerimientos son pocos. Un ejemplo de ellos son los utilizados en las neurociencias, por el tipo de lesiones que presentan.

Un modelo animal es considerado isomórfico si los síntomas en el animal son semejantes a los de los humanos pero la causa de estos síntomas difiere entre los humanos y el modelo. Sin embargo muchos modelos podrían ser no homólogos y no isomórficos y así llamarse “parciales”. Estos modelos no imitan por entero la enfermedad humana pero pueden ser utilizados para estudiar ciertos aspectos o tratamientos de la enfermedad humana. ^(34,35)

5.4 Clasificación de los Modelos de Enfermedad

La mayoría de los modelos animales de laboratorio son desarrollados y utilizados para estudiar la causa, naturaleza y la cura de desordenes humanos. Estos modelos convenientemente se categorizan en uno de los siguientes 5 grupos, de los cuales los primeros 3 son los más importantes.

1. *Modelos de enfermedad inducidos (experimentales)*
2. *Modelos de enfermedad espontáneos (genéticos)*
3. *Modelos de enfermedad transgénicos*
4. *Modelos de enfermedad negativos*
5. *Modelos de enfermedad huérfanos*

5.4.1 Modelos Animales de enfermedad Inducidos (experimentales)

Como su nombre lo indica, los modelos inducidos son modelos sanos en los cuales la condición a ser investigada es experimentalmente inducida. Como ejemplos tenemos la inducción de *diabetes mellitus* con el virus de la encefalomiocarditis o con la administración de alozana; el estudio de alergia a la leche de vaca mediante la aplicación (inmunización) de pequeñas dosis de proteína láctea; o la hepatotomía parcial para estudiar la regeneración hepática. ⁽³⁴⁻³⁶⁾

El grupo de modelos inducidos es la única categoría en la que teóricamente se permite la libre selección de especies. Una explicación para intentar justificar la extrapolación de las especies animales al humano es que a mayor semejanza entre estas especies y los humanos (alta fidelidad), mayor será la posibilidad de extrapolar; sin embargo, la cercanía filogenética, como la que se presenta en los modelos de primates, no es garantía para validar la extrapolación, tal como sucede en el fracaso de los modelos chimpancé para representar el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Así, se considera como decisivo que la patología y las consecuencias de una enfermedad o desorden inducido en la especie modelo seleccionada se asemeje a las lesiones respectivas de las especies objetivo.

El virus de la inmunodeficiencia felina puede, sin embargo, ser utilizado en muchos estudios como modelo del VIH; de igual forma se puede utilizar el virus de la inmunodeficiencia de los simios. Aunque los ratones y ratas tienen muchas características biológicas en común con los humanos, ellos no necesariamente sirven de la misma manera como modelos de enfermedad humana. Por ejemplo la esquistosomiasis puede ser estudiada en ratones infectados experimentalmente pero no en ratas, cuyo sistema inmune es capaz de combatir la infección de forma efectiva. ⁽³⁴⁻³⁶⁾

Muchos modelos inducidos son parciales o isomórficos debido a que la etiología de la enfermedad experimentalmente inducida en un animal es a menudo diferente de la correspondiente enfermedad en humanos. Algunos modelos imitan completamente la etiología, curso y patología de la enfermedad humana.

5.4.2 Modelos Animales de Enfermedad Espontáneos

Estos modelos de enfermedad humana ocurren de forma natural debido a variantes genéticas (mutantes). Muchos cientos de cepas y estirpes animales, con desórdenes hereditarios que representan condiciones similares a los de humanos se han caracterizado y conservado. Ejemplos clásicos de modelos mutantes espontáneos son: el ratón desnudo nu/nu, el cual dio un giro de 180° en el estudio del heterotransplante de tumores y el cual hizo posible la primera descripción de la células K naturales. Otros modelos espontáneos famosos son la rata espontáneamente hipertensa (SRH) y su control la rata Wistar Kyoto; el ratón de cola rizada cuyos fetos desarrollan un gran rango de defectos del tubo neural; el

ratón obeso ob/ob. Muchos de los mutantes están disponibles en cepas consanguíneas, con sus correspondientes cepas congénicas y coisogénicas.

Esto es muy útil porque la influencia de un gen o locus afectado puede ser específicamente estudiada por medio de una cepa de referencia, la cual tiene una base genética similar a la del mutante.⁽³⁴⁻³⁶⁾

Los modelos espontáneos son a menudo isomórficos, exhiben similitudes entre la enfermedad del animal y la correspondiente en el humano, esto es llamado “*face validity*”, y como ejemplo están la diabetes tipo I humana y la diabetes dependiente de insulina de la rata BB. Esta similitud en el fenotipo a menudo aumenta la similitud de reacciones al tratamiento entre los modelos animales y el paciente humano, por lo cual los modelos espontáneos son importantes en el desarrollo de tratamientos para las enfermedades humanas.⁽³⁴⁻³⁶⁾

5.4.3 Modelos de Enfermedad Transgénicos

El rápido desarrollo de la ingeniería genética y de las técnicas de manipulación embrionaria han hecho que los modelos transgénicos (genéticamente modificados) de enfermedad sean considerados como una de las más importantes categorías de modelos animales. Una gran cantidad de modelos animales de importantes enfermedades han sido desarrollados desde que estas tecnologías se encuentran disponibles, y el número de modelos animales se incrementa rápidamente. En este sentido los ratones son por mucho los animales más importantes para los propósitos de investigación transgénica, sin embargo modelos transgénicos, tanto de peces como de animales de granja, han sido desarrollados en los últimos años.

La vía más corta para determinar la función de un gen es alterarlo para observar la manifestación física (fenotípica) de esta manipulación y entender la característica funcional del gen. Los animales, obtenidos de esta forma se denominan *knockouts*. En años recientes ha sido posible “producir” ratones *knockout* con mutaciones específicas claramente definidas en un gen de interés.

Un **Ratón *Knockout* o Ratón KO** es un animal modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes sean inactivados mediante una técnica llamada “*gene knockout*”. El propósito es comprender el papel de un gen que ha sido secuenciado pero del que se desconoce ya sea total o parcialmente su función. Inactivando el gen y estudiando las diferencias que presenta el ratón afectado, los investigadores pueden inferir la probable función de ese gen. El ratón es el organismo modelo más próximo a los seres humanos en el que esta técnica se puede realizar con facilidad, además de que se conoce totalmente el genoma de este pequeño mamífero. Por ello se ha convertido en el sujeto favorito de los experimentos de noqueo, especialmente cuando se plantean cuestiones genéticas relacionadas con la fisiología humana.

El primer ratón *knockout* fue producido por Mario R. Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies en 1987–1989, obteniendo por tal logro el Premio Nobel de Medicina en el año de 2007. Los diferentes métodos para generar ratones *knockout* están en su mayoría patentados en Estados Unidos.

Uso

Algunos ejemplos de investigaciones en los que los ratones *knockout* han sido útiles son: el estudio y la caracterización de diferentes tipos de cáncer, de la obesidad, enfermedades del corazón, diabetes mellitus, artritis, toxicomanías, ansiedad, depresión, envejecimiento y Parkinson. Los ratones *knockout* también ofrecen un excelente modelo científico y biológico en el que se pueden desarrollar y probar fármacos y aplicar otras terapias.

Muchos de estos ratones modelo reciben el nombre del gen que se ha inactivado en ellos. Por ejemplo, el ratón KO p53 recibe este nombre por el gen p53, que codifica una proteína que normalmente suprime el crecimiento de tumores deteniendo la división celular. Los seres humanos que nacen con mutaciones que inactivan este gen padecen el Síndrome de Li-Fraumeni, una afección que aumenta drásticamente el riesgo de desarrollar tumores óseos, cáncer de pecho y hemopatías malignas en temprana edad. Otros modelos reciben nombres, a veces ingeniosos y creativos, de acuerdo con sus características físicas o comportamiento. Por ejemplo, "Methuselah" (matusalén) es un ratón *knockout* diseñado para estudiar los mecanismos del envejecimiento humano y la forma de aumentar la longevidad de la especie.

Limitaciones

Aunque la tecnología de los ratones *knockout* es una herramienta valiosa para la investigación, existen algunas limitaciones importantes:

- **Aproximadamente un 15% de los genes inactivados ("noqueos")** son letales en el desarrollo, lo que significa que los embriones genéticamente alterados no pueden llegar a ser ratones adultos.
- La falta de estudios sobre los límites del desarrollo embrionario en ratones adultos hace más difícil determinar la función de un gen en relación con la salud humana. En algunos casos, el gen podría tener funciones diferentes en adultos y embriones.
- Noquear un gen también puede que no produzca ningún cambio observable en el ratón o incluso producir características diferentes a los observados en humanos en los que el mismo gen está inactivado. Por ejemplo, las mutaciones del gen p53 están asociadas con más de la mitad de los cánceres humanos y a menudo conducen a tumores en un conjunto de tejidos en particular. Sin embargo, cuando se noquea en el ratón, los animales desarrollan tumores en un rango diferente de tejidos.
- Se ha probado que algunos loci genómicos son muy difíciles de noquear. La razón podría estar en la presencia de secuencias repetitivas, metilación generalizada del ADN o presencia de heterocromatina.

Existe otro tipo de organismos genéticamente modificados, en los cuales se ha reemplazado un gen normal por uno alterado con una mutación específica; estos animales reciben el nombre de *knockin*. Su elaboración es muy similar a la de un ratón *knockout*, sin embargo, en lugar de inhabilitar el gen, éste se reemplaza por otro. En algunos casos lo que

se hace es añadir la sección promotora para hacer que el gen modificado se exprese continuamente.

Muchos eventos fisiológicos están controlados por más de un gen (poligénicos), lo cual requiere de considerables actividades de investigación con el fin de identificar la contribución de los genes al normal o bien anormal mecanismo biológico. La inserción de DNA dentro del genoma de animales o la supresión de genes específicos da origen a resultados algunas veces impredecibles en términos científicos, y también en cuanto al bienestar de los animales, al menos en la primera generación producida. Una vez producidas las líneas transgénicas, pueden ser seleccionadas y cruzadas o clonadas para evitar la selección de un determinado genotipo. Esto no es correcto en ciencia, aunque la metodología es continuamente mejorada con el objetivo de eliminar efectos indeseables. Los procedimientos de manipulación embrionaria por sí mismos no parecen afectar el bienestar de las crías en ratones. ^(34, 40,41)

Las mutaciones inducidas por agentes mutágenos como la etilnitrosourea representan otras aproximaciones a la generación de nuevos mutantes, los cuales pueden servir como modelos de desórdenes humanos. En muchos aspectos, estos mutantes pueden ser similares a los mutantes espontáneos y a los generados por manipulación transgénica de embriones.

Esto ha allanado el camino para desarrollar nuevos modelos animales homólogos con el humano (validez construida) desde el punto de vista de genotipo y del fenotipo. Este desarrollo puede resultar en un cambio en el uso de modelos animales para la identificación de genes causantes o desencadenantes de enfermedades, estudiar el efecto de cambios en vías genéticas, interacciones genéticas e interacciones genéticas-medio ambiente. ^(34, 40,41)

5.4.4 Modelos de Enfermedad Negativos

Modelo negativo es el término utilizado para especies, razas o cepas en los cuales ciertas enfermedades no se desarrollan, por ejemplo: el moquillo canino no se transmite a otras especies, el sarampión no se transmite a perros y gatos. Los modelos de enfermedades infecciosas están a menudo restringidos a un limitado número de especies, por ejemplo el armadillo es el modelo animal para el estudio de la lepra humana, y las restantes especies que no responden a un agente infeccioso en particular pueden ser utilizadas como modelos negativos o testigos de ese organismo patógeno. Los modelos negativos por lo tanto incluyen animales que demuestran una falta de reactividad a un estímulo en particular. Sus principales aplicaciones son en estudios de mecanismos de resistencia lo cual permite la obtención de las bases fisiológicas moleculares de estos fenómenos. ^(34, 40,41)

5.4.5 Modelos de Enfermedad Huérfanos

Modelo huérfano es el término que se utiliza para describir un desorden funcional que ocurre de forma natural en especies no humanas. En ellas encuentra bien descrito, no así en los humanos, en los cuales puede ser reconocida como una enfermedad similar tardíamente identificada. Ejemplo: Enfermedad de Marek, papilomatosis, encefalopatía esponjiforme bovina, el virus Visna de los borregos, el virus de la leucemia felina y últimamente el virus de la gripe aviar. Así cuando se descubre que los humanos sufren de alguna enfermedad

similar, que por lo general ya ha sido ampliamente descrita en animales, siempre es de gran ayuda. ^(34, 40, 41)

5.5 Criterio de Selección del Modelo Correcto

Antes de seleccionar un modelo animal, el responsable principal de la investigación debe considerar las alternativas que existen al uso de animales vivos y tomar en cuenta que en el concepto de reemplazo está implicado el hecho de que si existe una técnica experimental en donde no sea necesario utilizar animales vivos, aún cuando esta sea más costosa, deberá implementarse. ⁽⁴¹⁾

La selección de la especie animal, la raza o la cepa que se utilizará, es una de las más importantes decisiones, que puede incluir hasta el uso de métodos sin animales (cultivos celulares, modelos matemáticos etc.)

A través de los años, se han desarrollado muchos y muy valiosos modelos no animales, los cuales se han refinado y ampliado sus características. Estos modelos son utilizados en varios tipos de investigación y ensayos de constatación y pueden ofrecer un suplemento extraordinario al trabajo con animales vivos. ⁽³⁴⁾

Anteriormente se ha determinado que el uso de animales de laboratorio es necesario, para lo cual debe seleccionarse la especie, raza, cepa o estirpe más adecuada. Los objetivos planteados en el protocolo de investigación juegan un papel importante en la selección del animal experimental que será utilizado. En el pasado y aún en la actualidad es bastante difícil predecir cuáles organismos pueden ser los mejores para obtener la mejor información en determinado estudio. En la investigación biomédica, la selección del modelo generalmente inicia con una investigación de aproximación a la homologación entre animal y humano o animal y animal. La validación de cualquier información derivada del animal es dependiente de su idoneidad para el estudio. Un buen ejemplo de la importancia de la selección de modelo animal apropiado es el llevado a cabo en la investigación de la restenosis vascular. ***Muchos de los datos de restenosis obtenidos en los modelos de cerdo y primate después de la angioplastia, son mucho más cercanos a los obtenidos en humanos, contrariamente a los obtenidos en pequeñas especies de animales de laboratorio.*** ^(34, 35)

Por ejemplo, en el cerdo, el pre-tratamiento con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) “cilazapril” falló al atenuar la mioproliferación de la capa íntima de la carótida después del profundo o ligero daño provocado por el balón. Mientras que en primates de forma similar la inhibición de la ACE no reduce el engrosamiento en arterias dañadas ya sea por endarterectomía, desgastamiento por el balón o por injerto vascular. En cambio, el pre-tratamiento con inhibidores de la ACE en ratas disminuye el engrosamiento de la capa íntima de las arterias en un 80% después del daño provocado por la colocación de un balón en la arteria carótida. ⁽³⁴⁾

Debido a que los nuevos modelos animales son identificados y caracterizados continuamente, la profunda revisión bibliográfica puede conducir a determinar el modelo más relevante para la investigación y si este se encuentra disponible.

Sin embargo, la selección de la especie no debe estar basada solamente en la disponibilidad, familiaridad o costo. En muchas ocasiones la facilidad para la obtención, la familiaridad con la especie, o el bajo costo de ésta no proveen de las características

genéticas, fisiológicas o psicológicas necesarias para cumplir los propósitos de la investigación.^(35,36)

Los modelos mamíferos se han usado en forma amplia, debido a sus obvias similitudes tanto en estructuras y funciones con el humano. Ratas, ratones, cobayos y hámsteres son los favoritos debido a su pequeño tamaño, corta vida, facilidad de manejo y alta tasa de reproducción. Los vertebrados, especialmente los mamíferos, proveen de los principales modelos para el estudio de los procesos patológicos de enfermedades del humano. El uso de estos modelos ha dado grandes dividendos en el conocimiento y control de enfermedades, así como en el estudio de los estados fisiológicos normales y se espera de éstos, que continúen proveyendo de información importante para la investigación biomédica.

Virtualmente es imposible dar reglas específicas para seleccionar el mejor modelo animal, debido a que existen muchas consideraciones que deben tomarse en cuenta al efectuar la selección; las cuales difieren con cada proyecto y sus objetivos. Sin embargo, existen algunas reglas generales que se mencionan a continuación:

- *La idoneidad de la similitud entre el modelo y la especie diana*
- *La capacidad de transferir la información*
- *La uniformidad genética del organismo*
- *El conocimiento general de sus características biológicas*
- *El costo y disponibilidad*
- *La aplicación general de los resultados a obtener*
- *La facilidad de adaptación a la manipulación*
- *Las consecuencias ecológicas del uso del modelo*
- *Las implicaciones éticas*
- *La disponibilidad de alojamiento adecuado*
- *El tamaño del animal*
- *La cantidad de animales que se requieren*
- *Período de vida*
- *Sexo*
- *La cantidad de datos que se necesitan*
- *La disponibilidad de equipo para la obtención de datos*
- *La edad de los animales*
- *Las necesidades de reproducción si se requiere progenie*
- *Conocimiento del comportamiento normal de la especie*
- *Conocimiento específico de las principales enfermedades de la especie*
- *Contar con personal capacitado en el manejo y cuidado de la(s) especie(s)*

(37)

Una vez que el modelo ha sido seleccionado, el investigador principal debe asesorarse de un médico veterinario familiarizado con la especie, capaz de identificar y recomendar publicaciones o sitios de Internet en donde exista información necesaria para enriquecer el conocimiento de la especie, y que por su experiencia pueda aportar información que no es fácil obtener en cualquier publicación.^(34,37)

Por último se considera que la selección del modelo animal es una prerrogativa del investigador responsable, sin embargo él debe convencer a la comunidad científica de la validez de su decisión.⁽³⁷⁾

5.6 Extrapolación de Animales a Humanos

Cuando los resultados experimentales se generan en un modelo animal, estos deben ser validados con respecto a su aplicabilidad en las especies objetivo, de las que la principal es el humano. El término “extrapolación” es utilizado a menudo para describir que los datos obtenidos en los animales son también de aplicación en humanos. Sin embargo, generalmente la extrapolación no se realiza en el sentido matemático, en el cual los datos se ajustan a cierta función que se puede describir gráficamente; la gráfica contiene más información de la que interesa describir con una ventana de observación.^(34, 35,39)

Tal vez lo más cercano a una extrapolación matemática en estudios con animales, sea establecer datos de toxicidad en animales y utilizarlos para determinar niveles seguros de exposición para humanos. Sin embargo, la mayoría de los estudios de la estructura y la función en animales nunca se extrapolan para describir aspectos correspondientes en humanos.⁽³⁴⁾

A pesar de que el valor predictivo de los estudios con animales puede parecer alto, estos no deben ser tomados como absolutos, sobre todo en algunas especies ya que la dependencia no crítica de los resultados de una mala prueba pueden ser peligrosos o engañosos e incluso, en algunos casos, dañar la salud humana. Lo que es nocivo y no efectivo en especies no humanas puede ser no nocivo y efectivo en humanos y viceversa; por ejemplo la penicilina es fatal para los cobayos pero generalmente se tolera bien en humanos exceptuando los casos de alergias; la aspirina es teratogénica en gatos, perros y cobayos, ratas, ratones y monos, sin embargo, es bien aceptada por los humanos, siempre y cuando no se administre a mujeres embarazadas.^(34,35)

La talidomida, droga desarrollada para evitar las náuseas, incapacitó a miles de niños en el mundo por su efecto teratogénico, sin embargo en las pruebas con ratas no mostró este efecto indeseable. Una cercana relación filogenética o similitud anatómica, no es garantía de que los mecanismos bioquímicos y moleculares, y por lo tanto la respuesta fisiológica, sea semejante.⁽⁴⁰⁾

No es posible plantear reglas generales para extrapolar resultados de una especie a otra. Esto debe hacerse de forma individual para cada experimento y posteriormente verificarse en otras especies. Un extenso y práctico punto de vista en el problema de la antropomorfización predictiva, especialmente en el campo de la investigación toxicológica, es el “Principio de la Extrapolación Animal de Calabrese”. La extrapolación racional de resultados a otras especies se basa en la mayor homologación y similitud evolutiva entre estructuras y procesos fisiológicos de las diferentes especies animales y entre los animales y el humano.^(34,39)

5.6.1 Requerimientos Generales para la Extrapolación

Para poder evitar la confusión o interpretación errónea de resultados, existen requerimientos vitales para una extrapolación comprobable:

a) Tomar un enfoque de pluriespecies. Muchas de las *normas regulatorias* requiere de dos especies en las revisiones toxicológicas, una de las cuales debe ser efectuada en un animal no roedor. Esto no necesariamente implica un aumento en el número de animales a utilizarse. El uso no crítico de modelos de una especie puede significar que los datos obtenidos no pueden ser extrapolados y representa un real y completo desperdicio de animales. Sin embargo el uso de más de una especie no garantiza por completo la extrapolación.

b) Similitud metabólica y velocidad y tamaño del cuerpo deben concordar entre especies. El uso de animales de laboratorio como modelos de humanos se basa a menudo en la premisa de que los animales son más o menos similares en muchas características biológicas a los humanos y así se pueden comparar con ellos. Sin embargo existe una diferencia notable entre el ratón y el humano y es su tamaño. Los mamíferos generalmente tienen un tamaño similar de sus órganos expresado en porcentaje de su peso corporal. Por ejemplo el corazón, casi siempre, pesa entre 5 y 6 g por kilogramo de peso corporal y la sangre constituye el 7% del peso corporal.^(34,39)

Se sabe que la tasa metabólica de animales pequeños es mucho más alta que la de animales grandes. Así también se ha demostrado que la densidad capilar en pequeños animales como los conejos incrementa dramáticamente cuando disminuye el peso corporal. Sin embargo, considerando que muchos animales son similares, como ya se mencionó, en el peso del corazón (0.5%) y en el volumen de sangre (7%), es obvio que para suministrar a los tejidos de pequeños animales con oxígeno suficiente para su alta tasa metabólica, no es suficiente con aumentar el volumen de sangre por latido. El volumen de sangre se encuentra limitado por el tamaño del corazón y la frecuencia cardiaca es el único parámetro que se incrementa, hasta llegar a frecuencias de 500 latidos por minuto. Otras variables fisiológicas, como la respiración y el consumo de alimento son afectadas de forma similar por la alta tasa metabólica de los pequeños mamíferos.

Así, los intentos de escalamiento deben ser objeto de consideración al calcular las dosis de drogas o de otras sustancias que se administrarán a los animales en el experimento. Si el objetivo es lograr igualar las concentraciones de una sustancia en los fluidos corporales de animales de diferentes tamaños, entonces las dosis se pueden calcular sencillamente por una proporción simple del peso corporal del animal. Pero si el objetivo es lograr una determinada concentración en un órgano en particular en un cierto período de tiempo, el cálculo de la dosis es más complicado, y otros factores deben ser tomados en cuenta, incluyendo las propiedades fisicoquímicas de la droga. Las drogas y las toxinas ejercen sus efectos en un organismo no por sí mismas (*per se*) y deben tomarse en cuenta las vías de metabolización, la tasa en que ellas y sus metabolitos son distribuidas, los límites de los tejidos corporales, y finalmente como y cuando son excretadas.⁽³⁴⁾

Por lo tanto, el metabolismo de detoxificación y excreción de una droga no está directamente correlacionado con el tamaño del cuerpo sino más exactamente con la tasa metabólica del animal.

La tasa metabólica de un animal se expresa por el consumo de oxígeno por gramo de peso corporal por hora y se relaciona con el peso corporal de la siguiente forma:

$$M = 3.8 \times BW^{-0.25}$$

En donde **M** es la tasa metabólica (consumo de oxígeno en mililitros por gramo de peso corporal por hora) y **BW** es el peso corporal en gramos. Esta ecuación puede ser utilizada para calcular dosis en animales de diferentes pesos corporales si se conoce la dosis en un animal o en el humano.

$$Dosis_1 = Dosis_2 \left(\frac{W_1}{W_2} \right)^{-0.25}$$

Donde:

W_1 : Peso corporal, en gramos, del animal cuya dosis se quiere calcular

W_2 : Peso corporal, en gramos, del animal cuya dosis se conoce

$Dosis_1$: Dosis desconocida, en mg/kg, que corresponde a W_1

$Dosis_2$: Dosis conocida, en mg/kg, que corresponde a W_2

La ecuación se puede considerar como ayuda para calcular la dosis necesaria de un medicamento por un animal, a partir de la dosis conocida del otro animal, sin embargo, deben tomarse precauciones cuando se pretenda hacer una generalización en su uso; se debe cambiar la potencia de $^{-0.25}$ a $^{-0.50}$ cuando el peso de los animales sea menor de 100g. Algunas especies reaccionan con particular sensibilidad hacia ciertas drogas, por lo cual pueden ocurrir marcadas variaciones en la reacción de los animales entre especies con respecto a la cepa (consanguíneas o no consanguíneas), pigmentación, estado nutricional, hora del día, nivel de estrés, tipo de cama, temperatura ambiente, humedad ambiental, iluminación ambiental, ciclos de luz/oscuridad y el uso simultáneo de otras drogas, entre otros. ^(34,39)

Ejemplos:

- a) Cálculo de la dosis de un animal a un humano (mayores de 100 g de peso)

W_1 : Peso del humano: 74000 g.

W_2 : Peso del conejo: 2800 g.

D_2 : Dosis del conejo: 60 mg/kg.

$$Dosis_1 = 60 \left(\frac{74000}{2800} \right)^{-0.25} = 26.46 \text{ mg/kg.}$$

- b) Cálculo de la dosis entre dos animales mayores de 100 g de peso

W_1 : Peso del perro: 18500 g.

W_2 : Peso del cerdo: 60000 g.

D_2 : Dosis del perro: 15 mg/kg.

$$Dosis_1 = 15 \left(\frac{60000}{18500} \right)^{-0.25} = 11.177 \text{ mg/kg.}$$

- c) Cálculo de la dosis entre dos animales menores de 100 g de peso
 W_1 : Peso de la rata: 80 g.
 W_2 : Peso del ratón: 18 g.
 D_2 : Dosis del ratón: 40 mg/kg.

$$Dosis_1 = 40 \left(\frac{80}{18} \right)^{-0.50} = 18.97 \text{ mg/kg.}$$

- d) Cálculo de la dosis cuando un animal pesa más de 100 g y el otro menos de 100 g

W_1 : Peso de la rata: 200 g.
 W_2 : Peso del ratón: 18 g.

$$Dosis_1 = 40 \left(\frac{200}{18} \right)^{-0.25} = 21.90 \text{ mg/kg.}$$

D_2 : Dosis del ratón: 40 mg/kg.

a) **Deben controlarse las variables confusas del metabolismo.** Algunas de éstas pueden, específicamente, atribuirse a las diferencias entre especies y/o cepas y deben ser esperadas y controladas, por ejemplo: edad, dieta, sexo, estrés, vía y tiempo de administración de las drogas, tiempo de muestreo, tamaño de la dosis, variación por la hora del día, temporada del año y la temperatura ambiental.

b) **Debe existir correspondencia entre el diseño experimental y las condiciones generales de vida de las especies seleccionadas.** Un modelo animal no puede por sí mismo separarse del diseño experimental. Si el diseño representa de forma inadecuada las condiciones de vida “normales” de las especies seleccionadas como modelo, es factible que se obtengan conclusiones incorrectas de los resultados de la experiencia esto, a pesar del valor del modelo por sí mismo. ^(34,39)

5.7 Descripción de los Modelos Animales

Una vez seleccionado un modelo animal, es obligación de los investigadores proveer de una descripción exacta del modelo. Esto incluye mucho más de lo que comúnmente se declara tal como “para el presente estudio se utilizaron ratones albinos”. Se deben incluir descriptores más específicos, como la cepa y subcepa si es aplicable, así como otras características genéticas especiales, siempre usando correctamente las reglas internacionales de nomenclatura. ⁽³⁶⁾

El *status microbiológico* necesariamente debe ser descrito. Los animales de tipo convencional, libre de patógenos específicos (SPF) y los axénicos responden de forma diferente a sustancias y agentes ambientales. Estas características deben ser descritas, completamente una vez que el estado microbiológico de los animales fue comprobado. ^(35,36)

La edad, características del alojamiento, dieta y sistema de crianza también deben determinarse, por ejemplo, “Ratones machos de 3 semanas de edad alojados individualmente en cajas de policarbonato con cama de viruta de madera (roble blanco)

esterilizada por autoclave y previamente tamizada, fueron alimentados con alimento ABC 202 previamente esterilizado por autoclave y agua esterilizada por acidificación mediante la adición de ácido perclórico para obtener un pH de 3.5". Está bien documentado que existe una diferencia drástica en la respuesta a una droga que se obtiene de dos animales genéticamente idénticos si uno es mantenido en cajas transparentes con un alimento adecuado y una cama sin resinas comparado con otro mantenido en condiciones totalmente opuestas.

En el caso de modelos animales en los que se pretende desarrollar un proceso infeccioso, se debe describir la cepa del organismo patógeno, el método por el cual el inóculo fue preparado, la vía de inoculación y la dosis utilizada. Incluso la aplicación de anestesia durante la inoculación puede afectar la respuesta del modelo. Por ejemplo, por años se pensó que la infección en ratas SPF cepa F344 con dosis de 10^6 o más unidades formadoras de colonias (CFU) de una cepa de *Mycoplasma pulmonis* administrada en un bolo intranasal, era un modelo apropiado para representar la infección natural de micoplasmosis respiratoria murina (MRM). Sin embargo, en realidad el organismo causante de la infección natural se encuentra probablemente en el rango de concentración de 10^1 a 10^2 CFU/ en colonias de animales mantenidos bajo barrera. Además se sabe que ratones y ratas de cepas diferentes responden de forma distinta a diversas sustancias. ^(34,35)

5.8 El Ratón en la Investigación

Junto con las ratas y otros roedores (cobayos, hámsteres y gerbos), el ratón es el mamífero más utilizado en la investigación biomédica en el mundo. Su pequeño tamaño, fácil manipulación así como su disposición y bajo costo de mantenimiento lo han hecho el animal ideal para la investigación. Además de que se puede disponer de una gran cantidad de cepas con características específicas, deficiencias genéticas espontáneas o inducidas que representan un buen número de enfermedades humanas. Los principales usos del ratón son:

Cáncer: Mediante cruza consanguíneas, los investigadores han desarrollado ratones con leucemia, cáncer de glándula mamaria y de otros tipos y mediante estos modelos han desarrollado nuevas terapias.

a) Células de tumores humanos cancerígenos pueden ser transferidas a ratones inmunológicamente deficientes, lo cual permite estudiar diversos tipos de cáncer humano sin riesgo para esta última especie.

b) Estudios en ratones han encontrado que el sistema inmune puede ser estimulado al implantar tumores alterados genéticamente, lo que ha permitido plantear la hipótesis de que la terapia génica puede ser utilizada para combatir el cáncer.

Inmunología: Se ha tratado de encontrar con ratones el mejor modelo para estudiar el SIDA. Mucha de la información que se dispone a la fecha ha sido obtenida en estudios utilizando ratones, sin embargo ha sido imposible replicar totalmente la enfermedad en estos modelos.

Virología: La investigación con ratones ha sido de gran ayuda en el desarrollo de vacunas contra la influenza, polio, fiebre amarilla y rabia. Los ratones han sido utilizados también

para entender la relación del virus con su hospedero y así conocer adecuadamente a los agentes virales.

Tratamientos de fertilidad: El éxito logrado en la transferencia de embriones humanos es posible debido a la investigación previa en ratones. Estas técnicas también se han utilizado para mejorar la reproducción en especies domésticas y en otras en peligro de extinción.

Bioseguridad: El ratón es el animal más utilizado en la constatación de productos biológicos, incluyendo estudios a largo plazo de exposición a drogas, además de ensayos de seguridad en hembras gestantes, lactantes y recién nacidos.

5.9 El Conejo en la Investigación

La similitud entre la fisiología del conejo y del humano han hecho de este mamífero un buen modelo para la investigación de ciertas enfermedades humanas.

Inmunología: La habilidad para producir tumores en el conejo, hace de esta especie un modelo idóneo para el estudio de nuevas sustancias en la quimio/inmunoterapia, así como para el estudio de la inmunosupresión en ciertos tipos de cáncer.

Estudios de colesterol: Los conejos han sido utilizados en el estudio de drogas como el Probuco, las cuales disminuyen el colesterol sanguíneo y retardan el endurecimiento de las arterias. ^(34,42)

Ojo y oído: El conejo ha sido utilizado en el estudio de infecciones de oído medio e interno del tipo de las que afectan a millones de niños en el mundo.

a) También se utilizan en el estudio del entropión, condición en la cual las pestañas crecen hacia dentro de los ojos, así como también en el estudio del glaucoma, un aumento de la presión intraocular, que a menudo resulta en ceguera.

b) Aún cuando es una prueba bastante controvertible y en muchos países prohibida, los conejos se utilizan en países que carecen de mecanismos de supervisión, como reactivos para pruebas de irritación ocular (Prueba de Draize).

c) Millones de personas alrededor del mundo gozan de los beneficios de un trasplante de córnea, técnica posible sólo a los miles de ensayos que se efectuaron en conejos. ^(34,42)

5.10 El Gato en la Investigación

Los gatos representan tan sólo el 1% de los animales utilizados anualmente en investigación biomédica. Sin embargo las contribuciones, en los últimos años, de este mamífero son muy valiosas.

Investigación sobre SIDA: Los gatos desarrollan el síndrome de inmunodeficiencia felino, causado por un virus similar al VIH. Ambas enfermedades tienen síntomas similares (inflamación de nódulos linfáticos, pérdida grave de peso e infecciones respiratorias y digestivas). A través de la investigación con gatos, los investigadores también han descubierto una vacuna para la leucemia felina y se espera que a partir de este descubrimiento, el gato pueda ser usado como modelo para obtener una vacuna contra el VIH. ^(34,42)

Visión: Estudios en gatos han permitido a los investigadores obtener conocimiento sobre desórdenes de los ojos tales como: la ambliopía (visión defectuosa y borrosa, desaparecen

los colores y puede llegar hasta la ceguera) y el estrabismo. Los gatos también contribuyen a la investigación del glaucoma y de la cirugía de cataratas.

Sistema nervioso: Debido a la similitud en la fisiología del sistema nervioso entre gatos y humanos, los gatos constituyen un excelente modelo para estudiar la médula espinal, el sueño, y otros tipos de investigación en donde se involucre al sistema nervioso.

a) La investigación con gatos ha guiado al conocimiento de la función de las neuronas, los mecanismos de la transmisión químico-eléctrica de los impulsos nerviosos, funciones específicas de las neuronas, y la organización funcional del cerebro.

b) Los gatos se han utilizado en la comprensión de los mecanismos de recuperación posteriores a traumatismos y daños cerebrales.

c) Son también utilizados en estudios de gangliosidosis (desorden en el almacén de lípidos que causa, en humanos, anomalías esqueléticas y retardo mental).

Desórdenes del oído: Tanto los humanos como los gatos sufren de pérdida de la capacidad auditiva posterior a la exposición a altos niveles de ruido. Esta similitud ha conducido a los investigadores a estudiar el efecto del ruido en gatos y aplicar sus descubrimientos en humanos.

Diabetes: Gracias al uso de gatos diabéticos se ha comprendido la función de proteínas que bloquean la producción de insulina, lo cual puede llevar al descubrimiento de la cura de la *diabetes mellitus*.^(34,42)

5.11 El Perro en la Investigación

Los perros también representan aproximadamente el 1% de los animales utilizados en la investigación. Sus contribuciones en varios campos de la medicina han sido cruciales para la salud humana y de los mismos animales.

Investigación cardiopulmonar:

a) A partir de la experimentación con perros, los investigadores han comprendido cómo se lleva a cabo la actividad y función cardíaca.

b) Por medio de la investigación con perros se han creado diferentes técnicas y mecanismos para implementar procesos quirúrgicos como los bypass coronarios, el implante de marcapasos cardíacos y el trasplante de válvulas cardíacas.

c) Gracias a la investigación en modelos caninos cada vez se perfeccionan más las técnicas quirúrgicas utilizadas para resolver los problemas de defectos congénitos cardíacos y cardiopulmonares.

d) Desarrollo de modelos caninos para el tratamiento del enfisema pulmonar.

e) Los perros han sido vitales en el desarrollo de diversas técnicas de angioplastia.^(34,42)

Trasplantes de órganos: Los perros fueron los primeros modelos usados para comprender los procesos del rechazo a trasplantes y los procedimientos con los cuales se puede evitar.

Diabetes Mellitus: El descubrimiento de la insulina (1921), realizada por Banting y Best se realizó mediante estudios en perros y en la actualidad se sigue utilizando esta especie para estudiar métodos de trasplante de células β pancreáticas productoras de insulina.

Traumas y Choque: Los perros son mundialmente utilizados para entrenar a médicos y enfermeras en técnicas de emergencia. Los estudios en esta especie han conducido a técnicas novedosas en el tratamiento de los diferentes tipos de choque, hipertensión arterial, función renal y función cardíaca.

Sistema esquelético: La cirugía de trasplante de cabeza de fémur fue desarrollada y perfeccionada en perros para su posterior aplicación en humanos. De igual forma, las técnicas de reparación de fracturas y el uso de nuevos materiales para utilizarse en sistema óseo se han aplicado primariamente en perros. ^(34,42)

5.12 Los Primates no-Humanos en la Investigación

Aún cuando los primates no-humanos representan sólo una pequeña parte de los modelos animales utilizados en la investigación biomédica (aproximadamente 0.3%), éstos han hecho contribuciones muy importantes a la ciencia médica dentro de las que se pueden mencionar, desde la comprensión de enfermedades que afectan a los niños, hasta las neurociencias. Dentro de éstas se encuentran el desarrollo de la vacuna de poliomielitis (en la década de 1940, Jonas Salk, utilizando monos rhesus, aisló los tres tipos de virus de polio y, posteriormente, Albert Sabin desarrolló en 1963, utilizando la misma especie, la vacuna que se utiliza actualmente). El descubrimiento del factor Rh, que tuvo lugar en investigación realizada con monos rhesus, fue fundamental en el desarrollo de una vacuna contra la hepatitis infecciosa. ^(34,42)

SIDA: Con el uso de primates no-humanos, los científicos han ido aprendiendo como funciona el VIH en humanos, mediante el estudio de la infección de estos animales con el VIS (virus de la inmunodeficiencia simiae).

Cáncer: Por medio de técnicas quirúrgicas novedosas y utilizando a los babuinos como modelo animal se ha logrado extirpar, en médula espinal, células cancerosas sin afectar a la células sanas. El Tamarin cabeza blanca se está utilizando como modelo para la prevención y tratamiento del cáncer de colon.

Enfermedades cardíacas: Mediante suplementos dietéticos estudiados en primates no-humanos se ha logrado tratar las alteraciones que producen obstrucciones arteriales (producción de ateromas) y la arterosclerosis, de las principales causas de muerte debidas a trastornos alimenticios (obesidad).

Enfermedades infecciosas: Utilizando primates no-humanos se han probado algunas drogas de nueva creación para el tratamiento de la malaria, enfermedad parasitaria que mata alrededor de 2.5 millones de personas al año en el mundo.

Ojo: El desarrollo de técnicas quirúrgicas para extirpar el tejido cicatrizal retiniano ha permitido la regeneración de las células de la mácula. Esta investigación podría conducir a una cura de la degeneración macular humana, causa principal de ceguera en personas mayores de 55 años.

Farmacología: En la década de los 50's se desarrolló el primer anestésico no-volátil, el halotano, para lo cual se experimentó principalmente con primates no-humanos. Aunque inicialmente se trabajó con ratones, conejos gatos y perros, a partir de este descubrimiento

se han desarrollado una nueva generación de anestésicos generales sin los cuales las modernas y complicadas cirugías no serían posibles. Con modelos animales de primates no-humanos se estudia el efecto de drogas y de la contaminación ambiental en el sistema nervioso central.^(34,42)

5.13 Otros Animales

a) Cerdos: Son un modelo ideal para el estudio de quemaduras y su tratamiento, además de modelo para el estudio de la fisiología digestiva humana. Una de sus mayores contribuciones ha sido el coadyuvar al desarrollo de la tomografía axial computarizada.

b) Ovejas: Estudios en esta especie han hecho posible el desarrollo de técnicas para perfeccionar los implantes para la desviación arteriovenosa por medio de la cual los pacientes con falla renal pueden ser sometidos a diálisis por largos períodos de tiempo.

c) Armadillos: En los años 70 se refinaron los tratamientos contra la lepra utilizando mezclas de antibióticos y estas nuevas mezclas se probaron en armadillos. En la actualidad el armadillo de nueve bandas es ampliamente utilizado con el objeto de reproducir al *Mycobacterium leprae* y de esta forma efectuar estudios proteómicos y genómicos (el genoma fue completado en 1998) que permitan el desarrollo de nuevas terapias y a mediano plazo de una vacuna contra esta enfermedad.

d) Cobayos: Son utilizados principalmente en estudios de nutrición como son los de deficiencia de vitamina C.

e) Chinchilla: Se utilizan para el estudio de infecciones del oído medio.

f) Zarigüeyas: Modelo para el estudio de endocarditis bacteriana.

g) Anguilas eléctricas: Se utilizan para estudios de neurobiología.^(34,42)

5.14 Avances en Medicina Veterinaria

Se calcula que sólo alrededor del 5% de los animales que se utilizan en investigación biomédica son para estudios de medicina veterinaria; sin embargo estos estudios han llevado al desarrollo de tratamientos y/o vacunas contra enfermedades como rabia, ántrax, muermo, inmunodeficiencia felina, tuberculosis, fiebre de Texas, fiebre porcina clásica y parasitosis, entre otras.⁽⁴²⁾

6. IDENTIFICACIÓN DEL DOLOR, SU TRATAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DEL PUNTO FINAL ANTICIPADO EN LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

En la investigación biomédica que utiliza animales como reactivos biológicos, se tiene la obligación implícita de minimizar o eliminar el dolor innecesario y/o el estrés que éstos puedan experimentar durante el proceso experimental, ya sea durante la investigación, la enseñanza o la constatación de productos biológicos^(43, 44, 45).

En cualquier procedimiento en que se involucre a animales, cualquier dolor, estrés o disconfort presente o potencial debe ser evitado, minimizado o aliviado seleccionando un

adecuado, oportuno y anticipado punto final, el cual debe ser compatible con los objetivos científicos del proyecto. La selección del punto final debe involucrar la valoración de un médico veterinario experto en la Ciencia de los Animales de Laboratorio y en su caso del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio o Experimentación.^(46,47)

“Cualquier animal que esté siendo sometido a una experiencia severa de dolor o estrés debe ser inmediatamente muerto usando métodos aceptados que provean de una rápida pérdida de la conciencia”⁽²⁵⁾

“Experimentos como ensayos toxicológicos, investigación sobre el cáncer e investigación sobre enfermedades infecciosas, pueden requerir la muerte del animal”.⁽⁴⁵⁾

Para proveer de una analgesia efectiva, es esencial tener un buen conocimiento y comprensión del dolor animal.

I) Por lo tanto, es necesario conocer cuando puede presentarse dolor, qué tan prolongado puede ser, y cómo responden los animales a la terapia.

II) Es necesario considerar las ventajas y desventajas de los métodos existentes para manejar el dolor y cuál es el mejor para aplicarse en diferentes situaciones.

III) Para optimizar el manejo del dolor es necesario reconocer la presencia de dolor y evaluar su grado de severidad.

IV) Fundamentalmente, se necesita estar conscientes de que el dolor se presenta en los animales y de que esto resulta en sufrimiento, de forma semejante al mecanismo que se presenta en los humanos. También hay que estar convencidos de que es necesario evitar dicho dolor y sufrimiento en la medida de lo posible o bien, en su caso, aliviarlo con las prácticas adecuadas.

V) El tratamiento efectivo del dolor es muchas veces complejo y difícil. Las diferentes especies utilizadas en la investigación tienen diferentes reacciones a los estímulos nociceptivos, (v. gr. Traumas en tejidos), y manifiestan una compleja variedad de signos clínicos sugestivos pero no patognomónicos, además de que tienen respuestas diferentes a tratamientos específicos. Ajustar el tratamiento teniendo como referencia una sola especie, presenta una gran variación en las respuestas individuales a estímulos nocivos y de los requerimientos de analgesia.

VI) El dolor agudo varía en su severidad desde ligero hasta severo, es generalmente de corta duración y es inducido sobre todo por traumas, cirugía y enfermedades. El dolor agudo puede durar de días a semanas dependiendo del grado y extensión del trauma aplicado. La intensidad del dolor agudo siguiente al daño tisular es mayor dentro de las primeras 24 a 72 horas posteriores al daño. El dolor agudo frecuentemente responde de forma favorable a las drogas analgésicas. El dolor crónico, dura de meses a años y persiste más allá del tiempo usualmente requerido para sanar. El dolor crónico es a menudo más difícil de tratar que el dolor agudo y puede requerir un diagnóstico extenso y varias aproximaciones terapéuticas.

VII) Aunque es ampliamente aceptado que los animales experimentan dolor, es importante establecer las bases de esta presunción. No puede ponerse en duda, por

ejemplo que los animales tienen la habilidad para detectar daño o estímulos potencialmente dañinos, por ejemplo el frío o el calor excesivos, los estímulos nociceptivos y la elevada presión mecánica. ^(46,48, 49)

El dolor (en el humano) tiene tanto un componente sensorial como uno emocional. Sin la interpretación, por parte del cerebro, de la información sensorial que llega a través de nervios periféricos, las características desagradables y la naturaleza angustiante del dolor no se aprecia. El procesamiento inicial de la información se origina en el sistema de detección periférico, el cual percibe los estímulos potencialmente dañinos mediante lo que se conoce como nocicepción. Este proceso es virtualmente idéntico en los animales y en el humano, pero la interpretación de esta información en el SNC es necesariamente regulada por la experiencia.

Se ha discutido profundamente el hecho de si los animales poseen la misma o similar capacidad que el hombre para experimentar emociones tales como las despertadas por el dolor. Sin embargo la razón principal para que el debate continúe es que es imposible de ser investigado como estados emocionales directos y sólo puede inferirse por mediciones indirectas como es el análisis de las respuestas conductuales.

Cuando se comparan las estructuras del SNC que se cree están asociadas con la percepción del dolor, o al menos con los aspectos desagradables del dolor, es probable que la corteza pre-frontal tenga un papel importante. En el hombre la lobotomía pre-frontal fue usada en el tratamiento de algunos desórdenes psiquiátricos.

Los animales pueden desarrollar respuestas complejas que les permitan evitar estímulos dolorosos y estudios más detallados muestran que los animales pueden elegir auto-administrarse analgésicos cuando desarrollan condiciones de dolor crónico. ⁽⁴⁹⁾

Es importante examinar nuestras concepciones previas acerca del comportamiento crítico frente al dolor e intentar establecer cuáles son los signos clínicos que pueden indicar la presencia de dolor en las diferentes especies. Sin embargo, nuestra habilidad para reconocer el dolor en los animales continúa siendo pobre, por lo cual hemos adoptado una aproximación que hace posible el desarrollo de un sistema de calificación para perros, gatos, borregos, caballos, vacas y animales de laboratorio. ^(45,49)

Un punto importante, es que muchos de estos esquemas intentan diferenciar pequeños grados en la percepción animal del dolor. Reconociendo signos clínicos obvios que permitan caracterizar, sin dificultad, el dolor en algunas especies como el perro y los gatos, lo cual resulta en el uso apropiado de los analgésicos.

La potencial interacción entre la terapia con analgésicos y el protocolo de investigación debe tomarse en cuenta, sobre todo cuando se origina dolor postquirúrgico. Esto se equilibra cuando se reconoce que no se afecta significativamente a los resultados del experimento. Otras razones para tomarse en cuenta son las siguientes:

- i) El alivio del dolor post-operación en ocasiones puede provocar que el animal se provoque daño él mismo (v. gr. auto mutilación en conejos). Siempre que se efectúen procedimientos quirúrgicos, la administración de analgésicos debe asegurar la reanudación de la actividad normal.
- ii) Considerar que los analgésicos tienen efectos adversos como es la depresión respiratoria e hipotensión. Estos efectos secundarios de los opiáceos en animales

generalmente son menos marcados que en los humanos y pueden tener una consideración significativa cuando se planea un régimen de manejo postoperatorio.

iii) Se deben conocer las dosis apropiadas así como los regímenes de dosificación. Esto es un problema primario de la poca divulgación de la información existente. Virtualmente, todos los analgésicos existentes se han probado ampliamente en animales.⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾

Es bastante difícil extrapolar las dosis conocidas de una especie a otra, así como trasladar las dosis que son efectivas en la analgesiometría experimental a las que son apropiadas en la práctica clínica. Por ello es necesario obtener una guía de dosificación apropiada y segura que permita asegurar el correcto manejo del dolor en los animales.

1) Las drogas utilizadas para aliviar el dolor pueden tener efectos adversos sobre los resultados de un experimento donde se evalúe dolor o analgesia. Aunque esto puede ser ocasional, tanto con uno u otro tipo de analgésicos lo que hace pensar que la droga está contraindicada y puede no ser el analgésico apropiado. Más a menudo, la reticencia para administrar analgésicos está basada en la idea errónea de que el uso de cualquier medicamento adicional en animales sometidos a experimentación es indeseable.

La influencia de los analgésicos administrados en un experimento debe ser considerado en el contexto de la respuesta en conjunto del animal a la manipulación. La respuesta al estrés quirúrgico puede ensombrecer cualquier posible interacción adversa asociada al uso de analgésicos. Adicionalmente se debe considerar que muchos planes preparativos del manejo transquirúrgico fracasan en el control de variables como son la temperatura corporal, función respiratoria y presión sanguínea. Lo que parece ilógico es asumir que los cambios en la función de los sistemas respiratorio y cardiovascular son intrascendentes, pero que la administración de un analgésico puede invalidar el significado de los resultados. Se debe considerar como una responsabilidad ética del investigador dar una justificación razonable científicamente para explicar la no utilización de analgésicos. Es también importante considerar que la presencia de dolor puede producir cambios fisiológicos indeseables; mismos que pueden alterar radicalmente la recuperación de los animales después de algún manejo quirúrgico, como son la disminución en el consumo de agua y alimento, interferir con la respiración normal y reducir la conducta normal de sobrevivencia de los animales. La inmovilidad causada por el dolor puede provocar espasmos musculares, llagas por presión, irritación por orina, acumulación de heces y grandes complicaciones en las rutinas del manejo animal.⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾

6.1 Reconocimiento del Dolor

Las respuestas individuales y específicas de especie al dolor, son completamente variables; sin embargo es esencial que algún médico veterinario con experiencia en animales de laboratorio y/o experimentación evalúe a los animales que sufran dolor o que potencialmente puedan sufrirlo, con un conocimiento absoluto del

comportamiento típico y las manifestaciones individuales. Una parte importante para determinar si un animal tiene dolor radica en la habilidad para reconocer desviaciones del comportamiento y apariencia normal de los animales. En esta observación, los cuidadores y manejadores de los animales pueden ser los más capaces para reconocer hasta los cambios más sutiles que indique la presencia de dolor, los que de otra manera puedan pasar desapercibidos. ^(46, 48,49)

A continuación se describen algunos ejemplos de comportamientos que indican dolor, sin embargo, se debe aclarar que estos ejemplos no incluyen todos los posibles ni a todas las especies.

1) Cambios en “la personalidad” o actitudes. Animales normalmente quietos y dóciles se vuelven bruscamente agresivos, o al contrario. Un animal puede tratar de morder, especialmente cuando es palpado en la zona dolorosa. El animal no interacciona, con su manejador o con el investigador, de una forma normal, pero puede parecer retraído o temeroso.

2) Vocalizaciones anormales, especialmente cuando la zona dolorosa es tocada o cuando el animal es forzado a moverse. Las vocalizaciones tienden a ser un indicador insensible y no específico de dolor y pueden de forma individual no ser totalmente confiables para determinar si un animal requiere tratamiento para el dolor.

3) El lamido, mordisqueo y rascado de la zona con dolor, así como el sacudimiento de la parte afectada de forma exagerada puede llegar a provocar la automutilación.

4) Cambios en la apariencia del pelaje. El erizamiento del pelaje y una apariencia grasosa del mismo son indicativos de falta de acicalamiento, además la piloerección también es un signo indicativo de dolor.

5) Cambios en la postura o deambulación, cojeraso tensión del abdomen. Esconder alguna extremidad es especialmente notorio en perros, gatos y roedores que tienen dolor.

6) Cambios en el nivel de actividad, los animales pueden volverse inquietos y caminar y echarse repetidamente una y otra vez. En contraste un animal puede estar echado, letárgico y reacio a moverse protegiendo el área dolorosa.

7) Disminución en la ingestión de alimento y agua, con la consiguiente pérdida de peso y deshidratación

8) Cambios en la expresión facial, con las córneas opacas y las pupilas dilatadas; inmovilización de las orejas, presencia de muecas y somnolencia o comportamiento fotofóbico.

9) Sudoración y/o salivación excesivas. Los caballos frecuentemente sudan como respuesta al dolor, sin embargo esto no se presenta en los bovinos. Los roedores que sufren de dolor intenso presentan una gran salivación.

10) Descargas oculonasales. Las ratas angustiadas a menudo presentan pigmentos de porfirinas en sus lágrimas y parece que sangran por los ojos y nariz.

11) Rechinado de dientes. Es una conducta que comúnmente se presenta en conejos, vacas, borregos y cabras que experimentan dolor.

12) Cambios en los movimientos intestinales con diarrea que se seca en el perineo, disuria y tenesmos.

13) Otros parámetros que indican dolor incluyen aumentos en la frecuencia cardíaca, en la frecuencia respiratoria y en la temperatura corporal.

14) Se pueden evaluar cambios en la química sanguínea como es la presentación de hiperglucemia, y/o la elevación de glucocorticoides y de catecolaminas.^(46,48,49)

6.1.1 Indicadores de Dolor en Algunos Animales de Laboratorio

<i>Especies</i>	<i>Comportamiento general</i>	<i>Apariencia</i>	<i>Fisiología</i>
Rata	Actividad reducida; disminución en la ingestión de agua y alimento, lamido; automutilación; agresión y vocalización; aversión a otros animales.	Descuidada; pilo erección; postura anormal; encorvamiento; porfirinas (“lagrimas rojas”) ojos cerrados; pupilas dilatadas; descarga nasal.	Sueño interrumpido hipotermia; respiración rápida y superficial; gruñido con la espiración.
Ratón	Similar a la rata; incremento en el movimiento de las vibrisas.	Similar a la rata; sin descarga ocular de porfirinas.	Similar a la rata.
Cobayo	Vocalizaciones, corren en estampida al mínimo estímulo.	Similar al ratón.	Similar a la rata.
Conejo	Ansiosos; huidizos; vocalizaciones; agresividad; (rasguñan y muerden); apetito reducido; canibalismo de crías; inmovilidad.	Puede no mostrar grandes cambios.	Salivación; respiración rápida y superficial.
Perro	Agresividad (arañan y muerden), defensivos; vocalizaciones y aullidos; gruñidos; quietos, sumisos.	Entumecidos, inmóviles y/o echados; la cola entre las patas.	Temblorosos; jadeantes; orinan demasiado.
Gatos	Quietos; jadeantes; acicalamiento excesivo; cojeras; protegen su vientre; apetito reducido; actitud huidiza.	Expresión facial aprehensiva; escondidos entre las patas; encorvados; orejas planas; encogidos.	Temblorosos; jadeantes; orinan demasiado.
Caballo	Renuentes al manejo; actividad disminuida; apetito reducido; inquietud o depresión; renuentes a moverse; posición de las piernas inusual.	Apariencia ansiosa; pupilas dilatadas; ollares muy húmedos y brillantes; ojos vidriosos; cabeza baja.	Sudorosos.
Primates no-humanos	Gritan y/o gimen; reducción en la ingestión de agua y alimento; agresivos.	Posición en cuclillas; expresión facial triste o con muecas; apariencia desaliñada.	Temblorosos; jadeantes.
Cerdos	Actitud huidiza, renuencia a ser manejados, agresividad, chillidos, sobre todo al palparse áreas adoloridas.	Expresión facial ansiosa, inmóviles, tratan de ocultarse.	Temblorosos, jadeantes.

Borregos, Cabras y Vacas	Deprimidos, quietos, cabeza baja, sin interés en estímulos, cambios posturales, renuentes al manejo.	Cambios en la expresión facial, gruñidos, rechinado de dientes.	Jadeantes, respiración rápida y superficial.
Aves	Vocalizaciones, reacciones de escape, movimientos excesivos de la cabeza y el cuerpo, inapetencia.	Encurvamiento del cuerpo, ojos parcialmente cerrados, alas hacia atrás.	Incremento de frecuencia respiratoria y cardíaca.
Reptiles	Estremecimientos y contracciones musculares, intentos de ataque, anorexia, letargia y pérdida de peso.	Enrollamiento extremo.	

Adaptado por Villagrán V.C 2010

Peces

Es extremadamente difícil determinar la naturaleza de la respuesta al dolor en peces, se considera un error valorar esta experiencia de forma similar a la de los mamíferos. Los peces manifiestan una respuesta inicial al daño agudo o contacto con irritantes muy pronunciada, pero su respuesta al daño crónico, aún fuerte, es pequeña o ausente. Los peces con heridas severas, que pueden causar inmovilidad en mamíferos, pueden parecer normales e incluso comer normalmente. Los peces reaccionan a estímulos nociceptivos, como es el pinchazo con una aguja hipodérmica, con fuertes movimientos musculares. Cuando se exponen a estímulos ambientales nocivos como soluciones ácidas muestran comportamientos natatorios anormales e intentan saltar del agua, sus colores se tornan oscuros y sus movimientos operculares se hacen muy rápidos. ^(43, 45, 46, 48,49)

6.1.2 Tratamiento del Dolor

El tratamiento del dolor se debe adaptar a cada animal, y puede basarse, en parte a las especies, raza, edad, procedimiento experimental y grado del daño causado, las características del comportamiento individual, estado de salud, grado de dolor y la disponibilidad de drogas y técnicas para aliviarlo. La selección de la droga analgésica más apropiada y de las técnicas requeridas para su aplicación debe ajustarse a los requerimientos del animal. ^(46,48)

El conjunto terapéutico apropiado puede usar una combinación de enfoques farmacológicos y no farmacológicos. El enfoque farmacológico involucra el uso de drogas con propiedades analgésicas como son los opioides, los agonistas $\alpha 2$, anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroidales. Las drogas con propiedades sedativas, como la acepromazina, generalmente carecen de propiedades analgésicas, pero pueden ser utilizadas para disminuir la ansiedad y mejorar la eficacia de los analgésicos comúnmente utilizados. Los sedantes y los tranquilizantes no deben ser la única fuente analgésica. Los agentes específicos a ser utilizados, así como la dosis y la frecuencia de administración deben

ajustarse a cada animal en lo individual. Está bien documentado que la dosis del analgésico a utilizarse necesita controlar varios grados de dolor y debe tomarse en cuenta que la duración en la acción de estas drogas también es muy variada.

Consecuentemente es importante supervisar el efecto terapéutico de la (s) droga (s) utilizada (s), para así poder modificar la dosis o la frecuencia de administración que se ajusten a las necesidades del animal. Las drogas analgésicas administradas antes de que se presente el dolor (analgesia preventiva), puede permitir mejorar el control del dolor durante el periodo post-intervención. Aunque todos los analgésicos, tranquilizantes y anestésicos locales poseen algunos efectos indeseables, estos efectos adversos pueden ser minimizados por la selección de la droga y la dosis más apropiada para cada individuo. ^(46, 48,49)

El uso de combinaciones de drogas analgésicas de diferentes clases (analgesia multimodal), puede mejorar considerablemente el efecto analgésico, así como reducir las dosis y de esta forma minimizar los efectos adversos.

La terapia no farmacológica para el alivio del dolor en animales incluye buenas prácticas de manejo, correcto soporte nutricional, acupuntura y la interacción con otros animales, así como con los manejadores.

Los animales deben ser alojados en lugares limpios, en áreas bien ventiladas y con el menor estrés posible. En animales de compañía (sobre todo perros), la interacción con los manejadores puede disminuir el estrés y permitir al animal superar y hacerle frente al dolor. ^(46,49)

6.2 Guías para Seleccionar un Punto Final Humanitario Durante la Experimentación Utilizando Animales.

Una vez que se ha reconocido el hecho de que todos los animales vertebrados son capaces de experimentar dolor y estrés, es esencial que el investigador principal o tutor de un alumno que maneja animales con fines experimentales, de docencia y de constatación de biológicos, considere el bienestar de los mismos y planifique su experimento. ^(44,47)

Los tipos de estudios que son más invasivos y que como consecuencia pueden causar dolor intenso y estrés son principalmente: estudios en animales transgénicos en los cuales se crean tumores y estos se propagan; la administración de drogas tóxicas y modelos animales de enfermedades crónicas.

Por lo tanto el investigador principal es responsable debe cumplir los siguientes puntos:

- *Conocer los aspectos clínicos de la enfermedad, para así poder predecir el curso de la enfermedad y el grado de daño que pueda hacer.*
- *Observar a los animales diariamente, incluyendo fines de semana, sobretodo cuando el daño puede ser agudo o repentino, como en los ensayos de toxicidad.*
- *Planear el proyecto de tal forma que los momentos más críticos para el animal se presenten cuando algún miembro del grupo de investigadores esté presente.*
- *Definir anticipadamente, en el protocolo, los tiempos o signos para la intervención.*

- *Diseñar el experimento pensando en un animal siempre en buen estado, considerando la minimización del sufrimiento y el uso del mínimo de animales; por ejemplo, cuando se implantan tumores debe procurarse hacer en áreas en donde se haga el menor daño o bien en áreas que no permitan la automutilación.*
- *Asegurar que las células tumorales inyectadas a los animales no estén contaminadas con agentes patógenos.*^(44,45,47)

En el caso de aquéllos estudios en los cuales la muerte de los animales es requerida como punto final del experimento tales como:

Estudios de toxicidad aguda, estudios de enfermedades infecciosas, ensayos de vacunas, ensayos de virulencia y algunos estudios de tratamientos de cáncer, el investigador principal debe proveer de la siguiente información:

- *Una justificación fuerte y plena de los beneficios que se obtendrán.*
- *El número de animales por grupo claramente definidos y justificados por medio de un adecuado método estadístico.*
- *Especificar claramente las razones por las cuales el experimento no puede ser modificado para aplicar un punto final anticipado a la muerte.*^(43,45,50)

6.3 SIGNOS PARA EVALUAR MORBIDEZ EN ANIMALES: Estado Mórbito

Es una condición típica relacionada con enfermedad o daño. Cualquier animal que exhiba signos de morbilidad debe ser reportado al responsable de la investigación o al médico veterinario responsable de la unidad animal.

Los principales signos del estado moribundo son:

- *Postura encorvada.*
- *Ojos hundidos, con o sin descargas.*
- *Respiración aumentada, disminuida, o esforzada-*
- *Pérdida rápida de peso (más de 10% del peso corporal en un período de una semana).*
 - *Pérdida total de peso de más del 20% del peso inicial. El criterio para evaluar la pérdida de peso es diferente en animales jóvenes que en animales adultos. En general el término “pérdida de peso” no es aceptable en animales en crecimiento en donde se aplicará el término “reducción en la ganancia de peso”*
 - *Disminución en la ingestión de alimento y agua.*
 - *Hipotermia o hipertermia.*
 - *Pelo hirsuto y/o erizado, falta de conducta de acicalamiento.*
 - *Diarrea o constipación.*
 - *Vómito.*
 - *Caminado inestable o tembloroso o cojeras no inducidos por la manipulación experimental.*

- *Tumores o úlceras.*
- *Dermatitis ulcerativa* ^(43,50)

6.4 SIGNOS PARA EVALUAR ESTADO MORIBUNDO: Estado Agónico o Moribundo (en fase terminal)

Se define como el estado que antecede a la muerte, la cual es inminente e inevitable. Cualquier animal que exhiba características de este estado debe ser inmediatamente separado y se le debe aplicar eutanasia por cualquier método aceptado como humanitario.

Una buena cantidad de investigaciones están asociadas con una alta mortalidad y requieren de la producción de una enfermedad severa y progresiva que seguramente provocará la muerte de los animales. Esta clase de experimentos debe incluir en el protocolo las especificaciones bajo las cuales se debe aplicar la eutanasia cuando los animales lleguen al estado moribundo.

Sin embargo las personas con diferentes preparaciones académicas y en muchos casos religiosas, pueden tener conceptos muy variados del concepto de “estado moribundo”. El diccionario define “moribundo” como el “estado de muerte”, el “punto de muerte” o “aproximado a la muerte”. Sin embargo estas definiciones se ven limitadas en cuanto a la investigación con animales debido a que no describen el estado en términos de conductas. Desarrollar un sólido abordaje para identificar el estado moribundo en estos animales es crucial para efectuar un correcto uso de los mismos y establecer el punto final más adecuado para la experimentación.

El estado moribundo típicamente implica el estado de debilidad severo que precede inminentemente a la muerte. El estado moribundo puede ser identificado mediante el análisis de varias variables que pueden servir como señales para aplicar una eutanasia preventiva.

Los datos recolectados durante la experimentación generalmente son sujetos a un estrecho escrutinio por parte de los miembros del grupo de investigación, lo cual incrementa la probabilidad de predecir cambios en los valores de variables que puedan reconocerse como claves. Además, esta estrategia facilita la rutina de colección de información relevante al estado moribundo de los animales como parte del experimento, sin necesidad de más trabajo.

Algunas variables consideradas para establecer el estado de moribundo son:

- a) Afectación en la movilidad, incapacidad para buscar alimento y/o agua.*
- b) Inhabilidad para mantenerse parado.*
- c) Postura encorvada por más de 48 horas.*
- d) Respiración dificultosa, cianosis, o bien ambas.*
- e) Deshidratación clínica y/o prolongada disminución en la ingestión de alimento (más de 48 horas).*
- f) Atrofia muscular, signos letárgicos y falta de actividad física.*
- g) Emaciación.*
- h) Diarrea crónica o constipación por más de 48 horas.*
- i) Presentación de valores hematológicos o bioquímicos que indiquen falla orgánica.*

- j) Hemorragia por cualquier orificio.
- k) Sin respuesta a estímulos externos. ⁽⁵¹⁾

6.5 Algunos Criterios de Ayuda para Aplicar la Eutanasia en Animales en Experimentación

- Pérdida rápida de peso (15 a 20 % en unos cuantos días).
- Pérdida de peso progresiva hacia el estado de emaciación (se observan y/o palpan las espinas vertebrales).
- Áreas extensas de alopecia causadas por la enfermedad o experimentación.
- Pelo hirsuto, postura encorvada, abdomen distendido, letargia, especialmente debilidad prolongada (3 días).
- Diarrea prolongada (3 días) que provoque debilitamiento.
- Tos, dificultad para respirar, descargas nasales.
- Ictericia y/o anemia.
- Crecimiento rápido de masas o signos clínicos de neoplasia.
- Signos neurológicos como torsión de la cabeza, tembor, espasticidad, convulsiones, caminado en círculos, parálisis o parexia y signos asociados con anorexia.
- Hemorragia por cualquier orificio natural.
- Poliuria, anuria y/o orina muy clara.
- Lesiones que interfieran con comer o beber.
- Signos clínicos sospechosos de enfermedad infecciosa que requiera la necropsia para su diagnóstico. ^(43,45,50)

Ejemplo de respuestas a variables generales y un sistema de puntaje para aplicar la eutanasia en roedores y lagomorfos. ^(43,45)

CAMBIOS EN EL PESO CORPORAL

Puntos	Condición
0	Normal
1	<10% de pérdida de peso
2	10 a 15% de pérdida de peso
3	>20% de pérdida de peso

CONDICIÓN FÍSICA

Puntos	Piel y pelo
0	Normal, limpio y ordenado
1	Pelo erizado
2	Piel erizada, pelo ralo y sucio
3	Zonas marcadas de alopecia, piel y pelo sucios.

OJOS Y NARIZ

Puntos	
0	Normal, húmedos y brillantes
1	Ojos cerrados, nariz tapada sin descargas
2	Ojos cerrados, nariz tapada con descargas o estado porfirico
3	Mucosas cianóticas

ACTIVIDAD

Puntos	
0	Normal
1	Disminuida, responden a estímulos umbrales
2	Inactivo, menos alerta, responden a estímulos más intensos
3	Automutilación, inmóviles, no responden a estímulos intensos, vocalizaciones

POSTURA

Puntos	
0	Normal
1	Sentado en posición ligeramente encorvada
2	Postura encorvada con la cabeza en el piso, vocalizaciones.
3	Acostado en decúbito sobre el piso

ALIMENTACIÓN

Puntos	
0	Normal
1	<10-15% de alimento o agua
2	Hasta 25% de alimento o agua
3	25% o más de alimento o agua

RESPIRACIÓN

Puntos	
0	Normal
1	Intermitente respiración por la boca
2	Respiración con la cabeza extendida, salivación
3	Respiración con la cabeza extendida y por la boca, salivación profusa, respiración laboriosa

Adaptado por Villagrán V.C 2010

La evaluación de los animales debe ser efectuada por un médico veterinario o uno de los investigadores adecuadamente capacitado. Se debe establecer con anterioridad el puntaje que nos indique el grado de sufrimiento de los animales y el momento en que es adecuado aplicar la eutanasia.

De los criterios arriba enlistados y calificados, se propone que si se obtienen por lo menos 9 puntos combinados o bien, 6 puntos en dos parámetros individuales, los animales deben ser separados del proyecto y se les debe aplicar la eutanasia. La disposición de los cadáveres debe estar de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA-2002.⁽⁵²⁾

TERCERA PARTE

MÉTODOLOGÍA DEL ESTUDIO, PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y ORGANIZACIÓN DE LOS RECURSOS

7.1 El Tipo de Estudio

Puede elegirse entre los siguientes modelos:

Observacionales.

Retrospectivos: Casos y controles.

Transversal.

Prospectivos: Cohorte.

De intervención:

Humanos y Animales: Ensayos clínicos aleatorizados.

Animales: experimentos.

7.2 Diseño de Experimentos con Animales

La investigación se debe entender como el proceso dedicado a responder una pregunta. No se trata de almacenar datos de forma indiscriminada, sino que se define como un proceso sistemático, organizado y objetivo destinado a responder una pregunta.⁽⁵³⁾ Por diseño de un estudio se entienden los procedimientos, métodos y técnicas mediante los cuales los investigadores seleccionan a los sujetos, recogen datos según un plan preestablecido que, una vez analizados e interpretados, modificarán o añadirán nuevos conocimientos a los ya existentes.⁽¹⁾

La ciencia de los animales de laboratorio se interesa en cómo desarrollar un buen experimento con animales. La Reducción, el Reemplazo y el Refinamiento, son requisitos sólidos para evaluar un trabajo de investigación y el diseño experimental antes de que el estudio comience. Por lo tanto, la ciencia de los animales de laboratorio, está interesada en el análisis estadístico, tanto antes como después del inicio del experimento.⁽⁵⁴⁾

Los experimentos diseñados y analizados de manera escueta, conducen a un desperdicio de los recursos científicos y puede llevarnos a conclusiones equivocadas. Las revisiones de artículos publicados por un número de autores, muestran que muchos experimentos son analizados estadísticamente de manera muy pobre y que una tercera parte de ellos son innecesariamente grandes. El buen diseño de los experimentos que involucran animales, tiene implicaciones tanto éticas como en el uso eficiente de los recursos científicos. Un experimento bien diseñado, debe ser capaz de responder los problemas a los cuales está orientado, con un alto grado de precisión, debe ser de un tamaño apropiado, no sesgado, debe hacer uso eficiente de los recursos y correctamente analizado, así que la información no se desperdicie. Un punto clave en el buen diseño de los experimentos, es controlar la variabilidad del material experimental y todos los procesos, tales como las determinaciones de laboratorio, que resultan en las mediciones o conteos numéricos finales. El éxito a este respecto, debe llevar a una reducción en el uso de animales. La falla nos lleva a la pérdida de animales, recursos y a conclusiones incorrectas. Cualquiera de éstos resultados es éticamente indeseable.⁽⁵⁵⁾

8. ELEMENTOS DE UN BUEN DISEÑO DE EXPERIMENTO

8.1 Estudios Preliminares o Piloto

Un estudio piloto o de factibilidad, es un pequeño experimento con un pequeño número de animales, diseñado para poner a prueba la logística, generar datos preliminares y permitir que todos los procedimientos se consoliden y se perfeccionen antes de la realización de un experimento de gran escala. Comúnmente se utilizan para probar nuevos procedimientos o bien constatar nuevos compuestos. ^(19,56)

Un estudio piloto puede revelar deficiencias en el diseño del experimento propuesto o en el procedimiento y posibilitar el que éstas puedan abordarse antes de que el tiempo y los recursos sean gastados en experimentos a gran escala. Comúnmente, los experimentos con animales no se realizan por separado, si no que forman parte de un programa de investigación. Una buena estrategia de investigación requiere de planeación muy cuidadosa y de un estudio piloto, que a menudo será parte de esta estrategia.

Normalmente, un estudio piloto es pequeño en comparación con el experimento principal y por lo tanto aporta información limitada de las fuentes y la magnitud de la variación de medidas de respuesta. Es improbable, por ejemplo, que un estudio piloto por sí solo pueda aportar datos adecuados sobre la variabilidad para un análisis de poder para estimar el número de animales a incluir en un experimento bien diseñado. Una revisión sistemática de la literatura o hasta una sola publicación es una fuente más apropiada de información sobre la variabilidad. Sin embargo, el estudio piloto sí puede aportar información vital sobre la severidad de los procedimientos y tratamientos propuestos.

8.1.1 Logística que Puede Surgir de un Estudio Piloto

Un estudio piloto podrá abordar una serie de cuestiones de logística. Como parte de la estrategia de investigación, los siguientes factores se pueden resolver antes del estudio principal.

- *Revisar que las instrucciones dadas a los investigadores (por ejemplo, procedimientos de aleatorización) sean comprensibles.*
- *Revisar que los investigadores y los técnicos estén suficientemente adiestrados en los procedimientos.*
- *Revisar la correcta operación del equipo.*
- *Habituarse al animal al manejo común que requerirá el experimento.*
- *Revisar la confiabilidad y validez de los resultados.*
- *Detectar un efecto de piso o techo (por ejemplo, si una tarea es demasiado difícil o demasiado fácil los resultados serán sesgados).*
- *Asegurar si el nivel de la intervención es apropiado (por ejemplo, la dosis del fármaco).*
- *Identificar efectos adversos (dolor, sufrimiento, estrés o daño prolongado) ocasionado por el procedimiento y la efectividad de las acciones para reducirlo (rango y dosis de analgesia e itinerario).*
- *Definir anticipadamente el punto final.*

8.1.2 Uso de los Datos y la Información Obtenida

La información obtenida sobre los puntos de logística, se deben incorporar al diseño principal del estudio. Como el propósito del estudio piloto es asegurar la factibilidad de un experimento, rara vez es sensible para presentar más que un resumen estadístico de los datos. De hecho, los datos pudieran ser irrelevantes si son descubiertos los problemas con los métodos.

Si un estudio piloto no lleva a la modificación de materiales o procedimientos, entonces sería conveniente que los datos se incorporaran al estudio principal. La estrategia de muestreo para seleccionar sujetos y la posibilidad de cambios sobre el tiempo, debería ser considerada cuidadosamente antes de la incorporación de los datos piloto. Aún si los datos piloto no son utilizados en esta forma, y el diseño final difiere marcadamente del piloto, es de gran utilidad incluir información sobre el estudio piloto en algunas publicaciones o reportes que surjan del experimento principal, ya que esto puede informar para el diseño de futuros experimentos.

Puede ser necesario realizar un segundo estudio piloto para asegurar el principal estudio ya revisado o en algunos casos tendrá que ser abandonado.⁽⁵⁶⁾

Todos los estudios piloto deben ser aprobados por el CICUAL de la institución, así como con cualquier experimento con animales. Tan pronto el estudio piloto se termine, el CICUAL debe dar la aprobación para proceder al experimento completo o debe indicar que los procedimientos experimentales, la hipótesis o bien, ambas, necesitan ser modificadas y evaluadas por estudios piloto adicionales.⁽¹⁹⁾

8.2 Unidad Experimental (ue)

La unidad experimental se define como la unidad que puede agruparse independiente al tratamiento. Es el objeto al que se le aplica el tratamiento y en el que se mide y analiza la variable que se investigay con ella se trabaja en el análisis estadístico. La unidad experimental suele ser una persona o un animal, pero no siempre es así; ya que puede utilizarse alguna parte del cuerpo a la que se la aplicará el tratamiento y en ese caso la unidad experimental sería esa parte del cuerpo del animal o persona, o cuando hay varios animales por jaula, de modo que resultara difícil medir alguna variable por individuo, la unidad experimental sería la jaula. La unidad experimental debe identificarse con precisión, si esto no sucede, puede ser que el experimento no sea analizado verazmente.^(54,57)

8.3 Sesgo

Los sesgos se definen como errores sistemáticos que se introducen en un estudio y que dan como resultado una estimación incorrecta (sesgada) del parámetro o del efecto de interés. Por lo tanto, la ausencia de errores sistemáticos, o sesgos, confieren validez interna a un estudio. A grandes rasgos, se pueden deber a la forma en que se seleccionan los sujetos de estudio, llamados *Sesgos de Selección* o a la manera en que se recoge la información, llamados *Sesgos de Información*.⁽¹⁾

La ausencia de sesgo se debe asegurar a través del uso de la aleatorización y cegamiento. Los animales se deben seleccionar y asignar a los grupos de tratamiento en una manera en

la que no haya diferencias sistemáticas entre los grupos antes de iniciar o durante la conducción del experimento.⁽⁵⁸⁾

Para evitar el sesgo se recomienda tomar en cuenta lo siguiente:

- *Ningún grupo de individuos debe tratarse de diferente forma de cualquier otro (excepto para las intervenciones aplicadas).*
- *Ningún grupo debe ser dosificado o medido primero, o por una persona diferente. La dosificación debe ser en orden aleatorio.*
- *Ningún grupo debe ser alojado en un cuarto diferente.*
- *Ningún grupo debe estar en un estante diferente dentro del cuarto de los animales. Las posiciones deben ser aleatorias.*
- *La unidad experimental debe ser correctamente identificada y apropiadamente aleatorizada y asignada a un grupo de tratamiento. Tal aleatorización debe aplicarse a todo el experimento. Donde sea posible, los investigadores deben cegar con respecto al grupo de tratamiento, particularmente si hay algún elemento subjetivo en el aseguramiento de la calidad de los resultados, tal como sucede en la lectura de laminillas de cortes histológicos.*

8.3.1 Evitando el Sesgo: Aleatorización

La aleatorización es fundamental para el diseño de experimentos de buena calidad; ya que reduce sustancialmente el posible sesgo; el cual puede surgir si los animales bajo un tratamiento difieren en alguna forma, de aquellos bajo otro tratamiento. Formalmente, debe hacerse de manera objetiva.⁽⁵⁹⁾

Lograr la aleatorización de los animales asignados a los grupos experimentales, es para asegurar que las variables fundamentales no resulten en datos sesgados de cada grupo experimental. Para lograr la aleatorización, es necesario comenzar con la definición de la población. Una *población homogénea*, consiste de animales que se considera que comparten algunas características (por ejemplo, edad, sexo, peso, raza, cepa). Una *población heterogénea* consiste de animales que pueden no ser iguales pero que tienen alguna característica común.⁽¹⁹⁾

Sin embargo, no es suficiente solo aleatorizar a los animales (u otros sujetos experimentales) y a los grupos de tratamiento, debe realizarse en cada una de las partes del experimento.⁽⁶⁰⁾

8.3.1.1 Métodos de Aleatorización

Para experimentos pequeños, la aleatorización física es fácil. Asumiendo que la meta es aleatorizar, por ejemplo, se tienen 30 animales para tres tratamientos (10 animales por tratamiento), entonces se tienen diez *unos*, diez *dos* y diez *tres* que se escriben en 30 cuadritos de papel, se doblan y se colocan en un recipiente; el cual es agitado. Se toma un papel y el primer animal es asignado al tratamiento indicado y así sucesivamente. También se puede realizar escribiendo en un papel el número y el tratamiento asignado antes de extraer al animal de su caja. Algunos programas de computadora funcionan de manera

similar a la aleatorización física. Un tercer método consiste en usar una tabla de números aleatorios, que están disponibles en muchos libros de texto de estadística.⁽⁶¹⁾

8.3.2 Evitando el Sesgo: Cegamiento

Para evitar el sesgo, los experimentos deben realizarse, cuando sea posible, a “ciegas” con respecto a los tratamientos y particularmente cuando existe algún elemento subjetivo en la evaluación de los resultados. Después de la asignación aleatoria de los animales (u otra unidad experimental) a los tratamientos, de las muestras y de los mismos tratamientos, deben codificarse mientras los datos son analizados. De esta forma, el investigador y otros miembros del grupo de colaboradores son ciegos, con respecto a los grupos que se les asignarán los tratamientos y también de éstos mismos.^(58,62)

8.3.2.1 Método de Cegamiento

Los animales u otras unidades experimentales y los tratamientos deben codificarse en una manera en la que sea imposible el tratamiento o al grupo de tratamiento hasta después de que el experimento haya sido descodificado. Por ejemplo, quien hace la dosificación de medicamentos para los animales, podría asignar los medicamentos y también etiquetar las jaulas del mismo color para que reciban el medicamento correcto, pero las personas que administran los fármacos no deben saber cuál es el placebo y cuál es el tratamiento. Los colores deben ser mezclados en cada nivel. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado para asegurar que el cegamiento no llevará a cometer errores.⁽⁶³⁾ También es recomendable que los tratamientos de placebo sean muy similares en apariencia a los tratamientos en prueba. De la misma forma, se debe permitir que solo una persona maneje a los animales con el objetivo de evitar un efecto Pavloviano; ya que los animales pueden distinguir a las personas en razón de su olor o los sonidos que producen.⁽⁵⁴⁾

8.4 Población de Estudio

En la formulación de los objetivos se indicó que llevan implícita una definición genérica de la población que se desea estudiar, pero es necesario establecer los criterios de selección de los sujetos a incluir en el estudio.

8.4.1 Niveles de Población

Pueden considerarse tres niveles de población:

POBLACIÓN DIANA O BLANCO: Es el conjunto de individuos al que hace referencia la pregunta de investigación u objetivo del estudio. Es la población a la que se desearía generalizar los resultados. Se define principalmente por sus características generales (especie, raza, sexo, genotipo) y en su caso, clínicas.

POBLACIÓN DE ESTUDIO: Subconjunto de la población diana al que se tiene la intención de estudiar. Se define por los criterios de selección establecidos en el

protocolo y presenta determinadas características temporales y geográficas que la hacen accesible a los investigadores.

MUESTRA: Conjunto de individuos realmente estudiados. En la mayoría de las ocasiones, el número de sujetos necesarios para la realización del estudio es mucho menor que el de candidatos que forman la población de estudio, por lo que por razones de eficiencia y disponibilidad de recursos, se selecciona una muestra.⁽¹⁾

8.5 GRUPOS DE CONTROL

Un conjunto de variables, tales como genéticas, medioambientales o de agentes infecciosos, pueden afectar de manera importante los resultados de los experimentos realizados con animales. Por lo tanto, es importante usar animales como controles para minimizar el impacto de esas variables extrañas o para reconocer la posible presencia de variables no deseadas. En general, cada experimento debe incluir grupos control de animales, que estén contrastados directamente con los grupos experimentales. Los tipos de grupos de control son: positivos, negativos, falsos, vehículos y comparativos.

8.5.1 Controles Positivos

En estos grupos, son esperados los cambios. Actúan como un patrón o estándar contra el cual se mide una diferencia de gravedad entre los grupos experimentales. Como ejemplo, una toxina se administra a un animal; la cual resulta en alteraciones fisiológicas o lesiones reproducibles, entonces los nuevos tratamientos a probar se aplican a los grupos experimentales para determinar si estas alteraciones se pueden prevenir o curar. Los controles positivos también se utilizan para demostrar que una respuesta puede ser detectada.

8.5.2 Controles Negativos

Se espera que no haya cambios del estado normal. Tomando el ejemplo anterior, el control negativo deberá consistir de animales no tratados con la toxina. El propósito de los controles negativos es asegurar que una variable desconocida no afecte, de manera adversa, a los animales durante el experimento; lo cual puede resultar en un falso-positivo.

8.5.3 Controles Falsos

Un control falso es utilizado para simular un procedimiento o tratamiento sin el uso efectivo del procedimiento o sustancia de ensayo. El placebo es un ejemplo de un control falso, frecuentemente utilizado en estudios de farmacología. Otro ejemplo sería, la implantación quirúrgica de “X” objeto en la cavidad abdominal. Los animales tratados deben tener este “X” objeto implantado, considerando que los animales que son el simulacro de control, deben tener el mismo procedimiento quirúrgico en la cavidad abdominal, como con los animales tratados, pero sin haber implantado el objeto “X”.

8.5.4 Controles Vehículos

Un control vehículo es utilizado en estudios en los cuales una sustancia, como solución salina o aceite mineral, por ejemplo, se usan como un vehículo para una solución del compuesto experimental. En un control vehículo, la sustancia inoculada (solución salina o aceite mineral) está sola y es administrada de la misma forma en la cual será utilizada con el compuesto experimental. Cuando son comparadas con el control no tratado, el control vehículo determinará si el vehículo por sí solo causa algún efecto.

8.5.5 Controles Comparativos

Un control comparativo, a menudo es un control positivo, con un tratamiento conocido que es utilizado para una comparación directa con un tratamiento diferente. Por ejemplo, cuando se está evaluando un nuevo protocolo quimioterapéutico preventivo en un modelo animal de cáncer, se debe comparar este protocolo, con el protocolo quimioterapéutico que actualmente está considerado como “aceptado en la práctica”, para determinar si el nuevo protocolo, en ese modelo, mejora la prevención de cáncer.⁽¹⁹⁾

9. CONCEPTOS PRÁCTICOS DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS, AUXILIARES PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

A diferencia de los estudios observacionales en los que el investigador describe circunstancias y efectos de los fenómenos naturales como los percibe, en un experimento, la mayoría de las condiciones que modifican los resultados son provocadas o se tienen en cuenta por el investigador; se obliga que todas las variables que se quieren comparar sean expuestas a las *mismas condiciones* y, hasta donde sea posible, se registran los efectos de las condiciones no controladas sobre los resultados. Experimentar implica contrastar ideas (hipótesis) y provocar que sucedan fenómenos, manipulando las circunstancias en las que se supone ocurren las cosas, para aprender de la experiencia, descubrir y explicar relaciones entre las causas y los efectos, descubrir nuevos hechos, o para confirmar o refutar resultados de investigaciones previas. La forma básica de un experimento plantea una relación entre dos variables y discrimina si al producir deliberadamente un cambio en una de ellas, se produce algún cambio correspondiente en la otra.

El experimento es un modelo de investigación de carácter hipotético-deductivo: infiere al contrastar suposiciones y deduce en función de la probabilidad de los resultados; sin embargo, el investigador debe tener cuidado de no caer en la falacia de que los resultados de un experimento se pueden generalizar a lo que sucede en la naturaleza (invalides externa). Este problema consiste en que el paso de *algunos* a *todos* los casos no garantiza que la conclusión sea verdadera, o al menos, nunca es definitiva pues ninguna ley lógica lo avala: “*las verdades parciales no satisfacen nunca, porque no constituyen la respuesta a lo que se busca*”⁽⁶⁴⁾, “*las verdades científicas siempre son parciales en el sentido de que son relativas al dominio de un objeto limitado que corresponde a un corte en la realidad, bajo un punto de vista determinado, dentro del cual se establecen métodos estandarizados para hacer comprobaciones empíricas*”.⁽⁶⁵⁾ Y si bien se obtienen resultados verdaderos, debe tenerse en cuenta que lo son sólo en las circunstancias específicas en que sucedieron, pero

que requieren ser validados por la experiencia como criterio de extensión a muchos casos: “*los experimentos no resuelven todos los problemas, debido al carácter dinámico-multifactorial de la naturaleza*”. Esto suscita la controversia epistemológica de que, en todos los fenómenos naturales, las condiciones originales que los producen están determinadas (determinismo), pero casi siempre se desconocen, o son tantas, que es imposible tenerlas en cuenta a todas.

En un experimento sólo se ensayan aquellas condiciones para las que se conozca el valor inicial de esa condición (fuentes de variación sistemática), mientras que las demás, aunque presentes y de valor inicial desconocido, se les deja actuar libremente y producir un efecto residual, aleatorio (fuentes de variación no sistemática). De hecho, la respuesta del material biológico en un experimento controlado se debe a la influencia de ambas fuentes, pero la atribución y la explicación de la causalidad de la respuesta a alguna fuente de variación en particular dependerá: i) del rigor científico de la metodología experimental empleada y el control ejercido sobre las condiciones experimentales para minimizar el sesgo y el error, ii) del conocimiento objetivo y cronológico que se tenga de las fuentes de variación sistemática, pues, ya que la respuesta en un experimento no controlado la mayoría de las veces depende de fuentes aleatorias, es difícil poder explicar las diferencias observadas y prácticamente imposible atribuir la respuesta a alguna causa específica.

En un experimento se instrumentan ensayos específicos para generar datos susceptibles de medir y de analizar en un sistema de condiciones controladas, manipuladas por el investigador. Se pretende obligar a la naturaleza a *responder* preguntas inventadas por el investigador y tener evidencia suficiente de que sus expectativas de la realidad son, por lo menos, razonables. La investigación experimental necesita ser planeada y estructurada sobre la base de un marco conceptual congruente con la teoría relevante existente: busca explicar la realidad desde la perspectiva del investigador y dar respuesta a preguntas que involucren un contraste entre su conjetura (hipótesis alternativa: H_A) y una condición opuesta, “*real o natural*” (hipótesis nula: H_0).⁽⁶⁶⁾

El investigador propone una hipótesis (alternativa) como la solución a la pregunta de investigación, mientras que la hipótesis nula *propone* el estado *real* de la naturaleza, un *efecto nulo* (que se supone ocurre naturalmente pero, además, es desconocido y opuesto a lo que supone el investigador). Para lograr avanzar en el conocimiento del fenómeno se contrastan estadísticamente las hipótesis esperando *falsar* la hipótesis nula. Si la probabilidad de la evidencia obtenida en el análisis es significativa con respecto a un valor crítico, se refuta la hipótesis nula (*se falsa o rechaza*), pudiéndose afirmar que la suposición del investigador tiene bases suficientes para ser aceptable.⁽⁶⁶⁾

Mediante el diseño del experimento, se confirman o se refutan suposiciones sobre el por qué de los fenómenos fisiológicos, patológicos, genéticos, conductuales. De esta forma se evalúa la relación causa y efecto entre las variables en un sistema cerrado de condiciones manipuladas o controladas. Con un diseño eficaz se pueden establecer las circunstancias y los elementos específicos que explican la ocurrencia de tales fenómenos. El plan de investigación experimental se concreta en el diseño del experimento, el cual tiene elementos metodológicos y estadísticos y debido a ello es fundamental la asesoría de estadísticos experimentados, no sólo para estructurar el análisis e interpretar los resultados, sino para planear el experimento y el cálculo del tamaño óptimo de la muestra.⁽⁶⁶⁾

El diseño es la arquitectura de la investigación, integrada por:

- i) la teoría relevante (marco teórico) y lo que se sabe (la evidencia o antecedentes) los referentes del problema (marco conceptual),
- ii) el modelo del investigador sobre el problema (cómo lo ve y supone que suceden las cosas),
- iii) el abordaje del problema (estrategia para resolverlo): variables, tratamientos (factores y sus niveles); relaciones buscadas entre las variables; características de la población objetivo y de la muestra, unidad de experimentación y de análisis, método de asignación de tratamientos, criterios y métodos de control y bloqueo, criterios de medición, control del error y precisión de las medidas, modelo matemático o estadístico, plan de análisis y criterios de interpretación de resultados.

Las siguientes, son algunas condiciones que deben ser establecidas claramente desde el inicio de la planeación de un experimento:

- ¿Qué tan ciertos deben ser los resultados?
Principios del Contraste de las hipótesis.
- ¿Cómo serán medidos los resultados en el experimento?
Identificar la Unidad Experimental
- ¿Qué resultados se esperan con el tratamiento estándar y control?
Determinar la variación experimental que puede esperarse y cómo tomarla en cuenta.
- ¿Qué tan grande será el experimento?
Determinar el número de animales necesarios en el experimento.
- ¿Cómo puede organizarse y dirigirse el experimento, así como la información que se obtiene de los animales empleados?
Elegir un diseño experimental efectivo.

Estas preguntas pueden responderse fácilmente si los datos anteriores (propios o de otros) están disponibles.

Los aspectos técnicos del experimento deben ser establecidos de manera clara:

- ¿Qué será medido?
- ¿Cómo serán analizados los resultados, tanto en el laboratorio como estadísticamente? ⁽⁵⁴⁾

En la planeación del diseño no deben faltar, como elementos indispensables, el número de animales por utilizar, la necesidad de estudios piloto, los métodos de aleatorización (asignación aleatoria de los tratamientos), el cegamiento (para la aplicación de tratamientos, recolección y análisis de la información), el tipo de variables estudiadas y el empleo de métodos estadísticos apropiados. ⁽⁶⁶⁾

El análisis estadístico aplicado al modelo pertinente está orientado a estimar el efecto de los tratamientos aplicados sobre una porción de material experimental (*unidad experimental, ue*) y separarlo de la variación no controlada.

Para lograr este propósito, se deben aplicar tres acciones indispensables: a) Aleatorización, b) Replicación y c) Bloqueo (Control local).⁽⁶⁷⁾

9.1 Aleatorización

Consiste en asignar aleatoriamente los tratamientos a las unidades experimentales. Ésta asegura: i) que cada *ue* tiene equiprobabilidad de recibir cualquier tratamiento, ii) eliminar el sesgo de favorecer o discriminar sistemáticamente algún tratamiento, por ser asignado a las *ue* en mejores condiciones, iii) independencia entre las observaciones, la cual es necesaria para hacer contrastes y estimar intervalos, significativamente válidos, de los parámetros.

9.2 Replicación

Consiste en repetir el experimento (básico), con lo cual se logra: i) estimar el error experimental midiendo varias observaciones en las *ue* que reciben el mismo tratamiento, ii) aumentar la precisión por reducir el error estándar del promedio de cada tratamiento, iii) ampliar la evidencia para hacer inferencia sobre el fenómeno: incrementar las repeticiones produce mayor diversidad de unidades en el experimento y mayor amplitud de condiciones en las que se puedan aplicar los resultados (validez externa).

9.3 Bloqueo (Control local)

Consiste en distribuir el material experimental en grupos o bloques de *ue* más o menos uniformes y luego, asignar aleatoriamente los tratamientos a las *ue* dentro de los bloques. En el análisis estadístico: i) se elimina la variación entre bloques del error experimental, lo que aumenta la precisión del experimento ya que con él se eliminan las diferencias entre bloques, ii) se comparan los tratamientos dentro de bloques de *ue* uniformes, en condiciones de mayor igualdad. El bloqueo aumenta la información del experimento en muchas condiciones, pues no es necesario colocar ni ensayar los bloques en el mismo sitio ni al mismo tiempo.

El efecto del tratamiento (resultado) se mide en cada *unidad de muestreo*, *um*, que es la fracción básica de cada *ue*, o bien, se mide en toda la *ue*: la *um* puede ser una muestra aleatoria, o la *ue* completa.

El efecto del tratamiento se refleja en la diferencia del desempeño entre las condiciones de la variable dependiente o respuesta (VD), anterior y posterior a la intervención. Los tratamientos son *niveles* específicos de *factores* del experimento (variables independientes, VI).

La manipulación experimental consiste en establecer los niveles de las VI; por ejemplo, para saber si el consumo dietético de un prebiótico aumenta la ganancia de peso corporal de gazapos recién destetados, en un experimento simple se forman dos grupos de gazapos y se les asigna aleatoriamente dos concentraciones diferentes del prebiótico (una a cada grupo), manteniendo las demás condiciones experimentales controladas; cada grupo de gazapos es una *ue* y cada uno dentro del grupo es una *um*, el prebiótico es el factor y cada concentración del mismo, el nivel o tratamiento.

Una vez formuladas las hipótesis y definidas las variables, las *ue* y las *um*, se requiere que el diseño sea parsimonioso: el más simple que aporte la precisión deseada; que las *ue* que reciban distinto tratamiento difieran de forma no sistemática entre sí; que el error experimental sea pequeño, usando el mínimo de *ue*; que el diseño propicie hacer el análisis estadístico de los resultados sin suposiciones artificiales y que las conclusiones del experimento tengan validez externa (que sean extrapolables).

Para lograr que el diseño experimental sea eficiente, el investigador debe apegarse estrictamente a un Plan General descrito en el protocolo de investigación, que dé validez interna al estudio y permita lograr los objetivos propuestos, para lo que debe asegurarse que se conoce:

- i) qué *respuesta* se quiere medir o estudiar;
- ii) cuáles son las *fuentes de variación o causas potenciales* del efecto por estudiar y de aplicar los controles apropiados en las que deban ser controladas;
- iii) el *espectro de respuestas* posibles del fenómeno de estudio y de emplear el material biológico apropiado y capaz de reaccionar homogéneamente a los tratamientos;
- iv) el empleo de *procedimientos óptimos de experimentación y medición* de las respuestas;
- v) que el *personal de investigación* posea las competencias científicas y técnicas pertinentes;
- vi) *formular el modelo* y emplear los *métodos estadísticos apropiados* para contrastar las hipótesis, registrar y analizar los resultados;
- vii) *interpretar* imparcial y éticamente los *resultados* en congruencia con los objetivos, la hipótesis, la significación de la respuesta, la decisión sobre el rechazo de la hipótesis y con sus implicaciones en el conocimiento del fenómeno de estudio.

9.4 Plan General para el Diseño y Ejecución de un Experimento

- Declarar los objetivos y la hipótesis.
 - Usar información documental que relacione la hipótesis con la teoría.
 - Establecer las condiciones experimentales en las que se aplicarán los resultados.
 - Formular una hipótesis conceptualmente clara, precisa y contrastable.
 - Proponer una hipótesis por cada objetivo, que sean congruentes entre sí.
- Metodología.

Caracterizar la población de origen en tiempo, lugar y sujeto.
 Declarar los criterios de inclusión, selección de la muestra y eliminación.
 Anticipar factores que puedan afectar los resultados.
 Discutir las técnicas experimentales a detalle para descubrir y evitar sesgos.
 Tener instrucciones claras de los procedimientos para asegurar su ejecución.
 Declarar los criterios de paro o punto final del experimento.
 Considerar el costo del experimento contra los costos de decisiones erróneas.
 Elaborar el diseño definitivo.
 Calcular el tamaño de la muestra y del experimento.
 Arquitectura.
 Declarar el tipo de diseño.
 Operacionalizar la variable de respuesta, los tratamientos y las *ue*.
 Determinar el número de: factores, niveles e interacciones, *ue*, repeticiones y mediciones en cada sujeto.
 Establecer los criterios de asignación de tratamientos.
 Formular el modelo estadístico del diseño.
 Establecer el criterio de significación estadística de los contrastes.
 Plan de análisis de resultados:
 Sistema de medición del efecto (instrumentos y escala).
 Criterios de precisión y exactitud (validez).
 Manejo de: datos, observaciones discrepantes, faltantes y pérdidas.
 Representación y análisis estadístico de resultados:
 Descriptiva:
 Resumen: Gráfico y numérico.
 Intervalos de confianza.
 Analítica: Contrastes de hipótesis, acordes con el modelo.
 Comparaciones.
 Asociaciones.
 Medidas de riesgo: epidemiológicas.
 Discutir los resultados comparando criterios estadísticos y clínicos.
 Considerar las implicaciones de los resultados y el alcance de las decisiones.

10. DEFINICIÓN DE LOS ELEMENTOS CRÍTICOS PARA SELECCIONAR UN DISEÑO

10.1 Medida de Efecto o Respuesta

La variable de respuesta (simbolizada por Y) es el efecto que resulta de la acción de los tratamientos sobre las unidades experimentales. La respuesta se puede medir en una escala discreta o bien continua. Cuando los resultados son casos que responden al tratamiento, las respuestas son eventos discretos (frecuencias absolutas) que se miden con una escala cualitativa (nominal, ordinal), pudiendo ser agrupados en categorías o clases. Los resultados de estos diseños, generalmente son analizados por medio de diagramas de mosaicos de respuestas y métodos estadísticos no paramétricos, como contrastes de asociación, pruebas para la mediana, análisis estratificado o de riesgo epidemiológico. No obstante, si las frecuencias absolutas son transformables a escalas cuantitativas continuas (intervalo, razón), ya sea a frecuencias relativas (proporciones), a escala logarítmica o a otra que se ajuste a la distribución normal, será posible emplear métodos estadísticos paramétricos, calcular estimados de tendencia central, variabilidad y error, explorar y describir los datos con diagramas de base matemática (histogramas, caja, dispersión), construir modelos lineales del diseño y hacer inferencia estadística y contrastes de hipótesis sobre los parámetros del modelo.

Es importante tener en cuenta que, a diferencia de los diseños univariados, en los que se mide una sola respuesta por cada *ue*, en los diseños de mediciones repetidas (correlacionadas), el tiempo puede constituir una variable explicativa importante. Estos diseños son comunes en ensayos clínicos para dar seguimiento de la respuesta a un tratamiento o determinar la cinética de un fármaco en el organismo a intervalos regulares.

En los diseños en que se mide una sola vez, más de una característica en cada *unidad*, o se mide más de una vez (en distinto momento), una sola característica en la misma *unidad*, se requieren modelos de mediciones repetidas, multivariados, o series temporales y respectivamente técnicas de análisis más complejas (MANOVA, análisis de perfiles, de parcelas divididas o modelos Box-Jenkins). Debe tenerse en cuenta que estos diseños exigen que los datos cumplan condiciones adicionales a las básicas de los diseños paramétricos univariados. No obstante, los diseños de observaciones repetidas en la misma *unidad*, son más eficientes que los de una sola observación en cada tiempo de observación en distintas *unidades*, porque el efecto de las mediciones repetidas es similar al del bloqueo ya que requieren menos unidades, se reducen los costos del experimento, la variabilidad entre medidas de la misma unidad es menor y se mejora la precisión de las medidas. Una excepción importante, es el diseño de un grupo con dos medidas correlacionadas (pareadas), de una variable de respuesta, realizadas en cada *unidad*, antes y después del tratamiento.

10.2 Modelo Estadístico

Un modelo estadístico formal expresa la relación entre los tratamientos y su efecto (observaciones). El análisis estadístico de un experimento se basa en el modelo estadístico correspondiente. En estudios comparativos, el modelo supone la existencia de una

población de unidades teórica, de referencia, en la que cada *unidad* tiene un valor Y_i para la variable de respuesta Y , que se distribuye normalmente con promedio μ y varianza σ^2 (Figura 5).

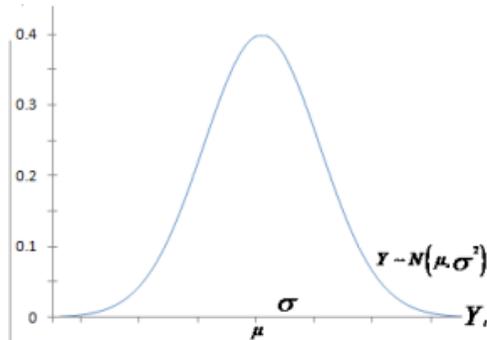


Figura 5. Modelo Estadístico

El modelo estadístico más simple, describe que una observación es resultado de la relación lineal aditiva del promedio y los errores independientes distribuidos normalmente:

$$Y_i = \mu + J_i$$

donde:

Y_i : Respuesta de la i -ésima ue.

μ : Promedio general de la población.

J_i : Error aleatorio, asociado a cada respuesta:

$$\varepsilon_{i,lD} \sim N(0, \sigma^2)$$

El modelo requiere que las observaciones sean independientes, se distribuyan normalmente y los errores sean aleatorios y no correlacionados. Esto se asegura al tener una muestra aleatoria de la población de Y 's, y que hace al modelo probabilístico, más que determinístico. El modelo se aplica al problema de hacer inferencias acerca de promedios y varianzas poblacionales.

Cada diseño tiene un modelo lineal particular que lo representa, en el que se incluyen las fuentes sistemáticas de variación y el error asociado a cada respuesta; se expresa por una ecuación de los parámetros de interés y el error. Por ejemplo, para evaluar el *efecto de tratamiento* se puede emplear el modelo completamente aleatorio de un factor, de efectos fijos, balanceado, con r repeticiones por tratamiento (t), que se expresa:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \left\{ \begin{array}{l} i=1,2,\dots,t:\text{Tratamiento} \\ j=1,2,\dots,r:\text{Repetición} \\ \varepsilon_{i,lD} \sim N(0, \sigma^2) \end{array} \right.$$

Donde:

y_{ij} : Respuesta del j-esimo sujeto en el i-esimo tratamiento.

I : Promedio general.

Π : Efecto del j-esimo tratamiento.

J_{ij} : Error aleatorio de la j-esima respuesta en el i-esimo tratamiento.

Los diseños se eligen de acuerdo al efecto (parámetro) que se quiere estudiar, tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- i) Tipo y número de factores o bloques: uno, dos o más
- ii) Modo de selección de los parámetros: efectos fijos, aleatorios o mixtos
- iii) Interacción o jerarquía (anidamiento) entre los factores;
- iv) Simetría del arreglo experimental: diseños completos, incompletos o fraccionales, balance de los tratamientos;
- v) Condiciones especiales: superficie de respuesta, parcelas divididas, ensayos clínicos: control de regresión (análisis de covarianza), grupos paralelos, cruzados, mediciones repetidas, asociación (regresión lineal).

11. CRITERIOS AUXILIARES PARA LA SELECCIÓN DEL PATRÓN (ESTRUCTURA) DEL DISEÑO

Una investigación puede ser de tipo pre-experimental, experimental (experimento verdadero), cuasi experimental (pseudoeperimento) y correlacional (Experimental Post Facto). Cada tipo está representado por un paradigma (diagrama simbólico) de la estructura interna de los elementos y el orden en que suceden las intervenciones y las respuestas. El paradigma muestra el arreglo geométrico de la combinación de los grupos, la forma de asignación y tipo de tratamiento, así como el número y frecuencia de las mediciones de la respuesta.

La intervención, introducida por el experimentador, puede ser: experimental (tratamiento novedoso), convencional (tratamiento convencional o control positivo), placebo (pseudotratamiento o grupo de control), o la simple ausencia de cualquier tratamiento. Las respuesta en cada *unidad* se puede medir: *sólo después* (de la exposición al tratamiento: X), *antes y después* (de la exposición), o *múltiplemente después* (en más de una ocasión después de la exposición).

La diferencia que distingue a los diseños de experimentos verdaderos de los pre- o los cuasi-experimentos consiste en que estos dos últimos carecen de *validez interna*, sin embargo se les describe a continuación como medida de precaución para el investigador:

11.1 Diseños Pre-experimentales

Diseños sin asignación aleatoria de los tratamientos. Los grupos de observación no son asignados aleatoriamente a los tratamientos antes del experimento, lo cual, además de

impedir controlar la manipulación experimental del mismo, hace que el error no se distribuya aleatoriamente entre las observaciones; esta es la principal causa de invalidez interna de los experimentos.

Diseños de una sola medición. Paradigma: $_ X O_{Xd}$ Las observaciones se realizan sólo sobre un grupo único, después de una intervención, casi nunca controlada. Sucede en muchas situaciones fortuitas que tratan de demostrar que cierto efecto se debe a una *causa* antecedente, pero se carece del grupo de control. Debido a ello, el resultado sólo *sugiere* la posible *influencia* de la intervención pero no hay forma de demostrarla: es imposible comparar el efecto de algo contra nada; “se puede observar que la exposición, por única ocasión, de ratones al frío les causa diarrea”, pero la relación es espuria y no debida al frío.

Diseños de comparación de grupo estático. Paradigma: $_ X \infty _ _$ aunque tienen un grupo con intervención y uno de control, se desconoce la condición pre-experimental de ambos. Así, si existieran diferencias entre los grupos después de la intervención, ésta sería aparente pues se ignora si los grupos ya eran diferentes desde antes de la intervención. Esto sucede con muchos experimentos con animales que no consideran su condición pre-experimental, ni usan controles metodológicos ni estadísticos (covarianza) para analizar las diferencias entre los grupos.

Diseños pretest-posttest de un grupo. Paradigma: $O_{Xd} X$ Compara la diferencia del desempeño antes y después de una intervención, pero el efecto de ésta es aparente pues sólo existe un tratamiento, el cual no se asignó aleatoriamente y falta grupo de control: “en un experimento con *pollos*, se afirma que el consumo de dietas con *mucha energía* causa *mayor mortalidad por síndrome ascítico en machos que en hembras*”; si el experimento sólo se hizo con machos, la elevada mortalidad puede ser fortuita, el diseño no tiene validez interna, pues faltan niveles de tratamiento (otras concentraciones de energía), y faltan grupos de control (al menos un grupo de hembras).

11.2 Diseños Cuasiexperimentales

Se utilizan para investigar situaciones donde no es posible seleccionar, ni asignar aleatoriamente las *ue* a los tratamientos. Incluyen diseños de series temporales de uno o dos grupos, intervenidas o con un control. Cuando no se aplica intervención sirven para estudiar el curso temporal (histórico) de un fenómeno, y cuando se aplica, sirven para estudiar la influencia de la intervención en la evolución del mismo; la introducción de un grupo (o más) ya sea de tratamiento o de control (positivo, negativo) aporta validez interna al diseño.

Sucesiones temporales sin intervención. Son útiles para estudiar la historia natural del fenómeno en el cual interesa conocer el desarrollo progresivo de un fenómeno por medio de su estacionalidad, los ciclos y la tendencia. Por ejemplo, son aplicables al estudio de eventos fisiológicos en condiciones naturales o en ambientes controlados, como electrocardiogramas (ECG), electroencefalogramas (EEG), temperatura corporal o ciclos

de vigilia-descanso. También sirven para estudiar y caracterizar la historia natural de una enfermedad, aunque requieren control estricto de las condiciones de observación ya que es difícil controlar muchas variables ambientales y los resultados dependen de la calidad de los registros históricos de los eventos y de homogeneidad de la respuesta de las unidades de observación en el transcurso del tiempo, debido a la influencia de su *maduración* o *envejecimiento*.

$$O_{a1}, O_{a2}, O_{a3}, \dots, O_{a(x-1)}, O_{d(x+1)}, O_{d(x+2)}, \dots, O_{dk}$$

Sucesiones temporales con intervención. Además de conocer el desarrollo progresivo de un fenómeno, estos diseños son útiles para conocer si una manipulación o intervención natural modifica su desempeño en el tiempo. Por ejemplo sirven para estudiar si la administración de un fármaco mejora el cuadro clínico de un paciente (o de una condición clínica en grupos de pacientes similares). Estos diseños son parecidos a los de mediciones repetidas.

$$O_{a1}, O_{a2}, O_{a3}, \dots, O_{a(x-1)} \text{ X } O_{d(x+1)}, O_{d(x+2)}, \dots, O_{dk}$$

Sucesiones temporales con intervención y grupo de control. Este diseño aporta información adicional al de una sola intervención, para determinar si la manipulación o la intervención natural modificaron significativamente el curso del desempeño del fenómeno con respecto a un grupo de control. Son útiles para comparar la eficacia entre procedimientos terapéuticos novedosos o contra alguno convencional o placebo.

$$O_{a1}, O_{a2}, O_{a3}, \dots, O_{a(x-1)} \text{ X } O_{d(x+1)}, O_{d(x+2)}, \dots, O_{dk}$$

$$O_{a1}, O_{a2}, O_{a3}, \dots, O_{a(c-1)} \text{ C } O_{d(c+1)}, O_{d(c+2)}, \dots, O_{dk}$$

11.3 Diseños Experimentales

Los experimentos son ensayos longitudinales que estudian el efecto de una o más variables independientes (*factores*) sobre la respuesta inducida en una muestra aleatoria de una población. Como se muestra en la figura 6, en todo diseño experimental, la muestra de estudio procede de una *población objetivo*, caracterizada por sus determinantes de tiempo, lugar y sujeto. Una vez definida la población elegible, se selecciona una *muestra aleatoria* de tamaño mínimo, predeterminado por los requerimientos del diseño, formada por sujetos que cumplan estrictamente con ciertos *criterios de inclusión*, que constituyen el *perfil* de las características de los sujetos requeridas por el experimento. Integrada la muestra, con los sujetos se forman grupos de *unidades experimentales (ue)*, a las que, de manera *aleatoria*, se les asigna un *tratamiento* específico (experimental, de control o de otro tipo), el cual es la *intervención* (exposición) o manipulación deliberada del investigador sobre las unidades

de observación. La asignación aleatoria de los tratamientos a las *ue* antes de su exposición al tratamiento, es un recurso que garantiza la distribución homogénea del error experimental entre las *ue*, asegura la comparación óptima de los grupos y resuelve la dificultad lógica y estadística de la validez interna y externa de los resultados. Los ensayos clínicos controlados (en humanos), son diseños equivalentes a los experimentos con animales; análogamente, comparan el resultado entre dos o más grupos con intervención y en los que al grupo o grupos (tratamiento) adicional(es) al experimental se le(s) denomina *paralelo(s)*.^(68,69)

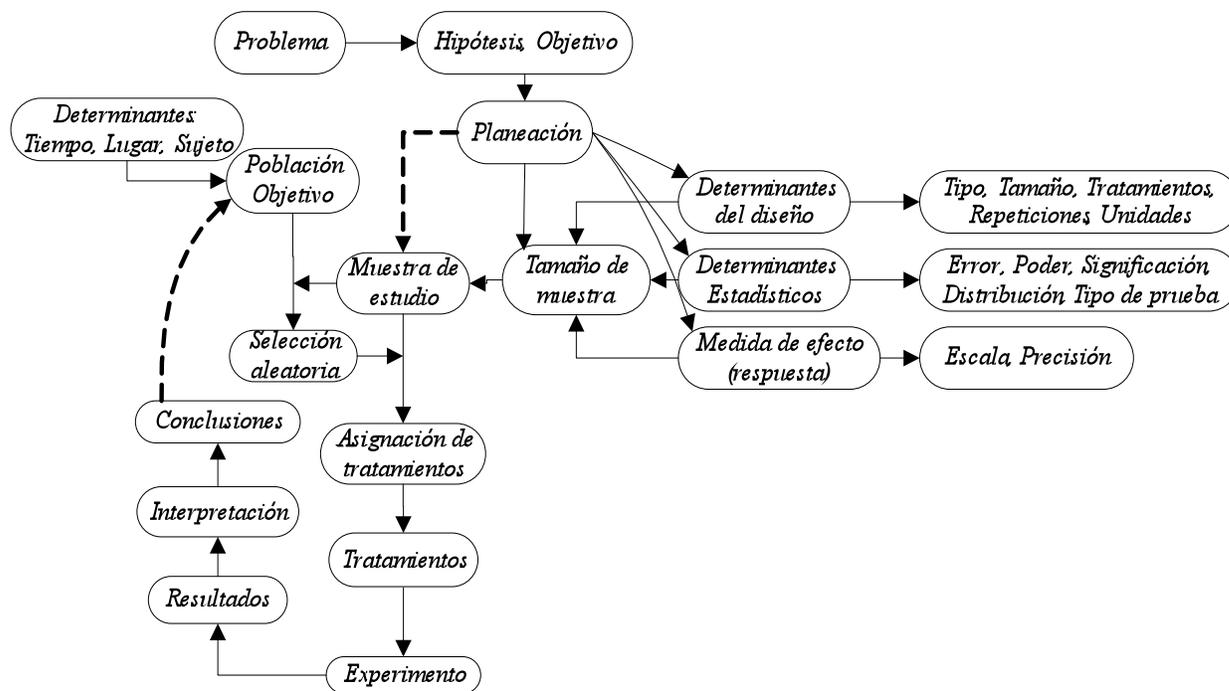


Figura 6. Modelo conceptual de la importancia de la muestra en el diseño de un experimento. Navarro HJA, 2010.

Como regla general, todo experimento debe ser presentado de forma que cualquier otro investigador pueda repetirlo. Para ello, se debe justificar claramente la razón de elegir el modelo animal, la especie, la cepa, la fuente de los animales y declarar detalladamente el número de animales, el método de aleatorización, los métodos estadísticos y las implicaciones éticas del estudio.

Existen muchas variaciones en la estructura (*paradigma*) de estos diseños, la cual está determinada por el número de intervenciones y su tipo, la estratificación o clasificación de las *ue*, el número de factores y niveles de cada factor de estudio y la interacción o el anidamiento de los factores; aquí se describen solamente los más empleados en experimentación con animales. Una clasificación más completa para otras áreas se puede encontrar en (Campbell & Stanley, 1963).⁽⁷⁰⁾

La figura 7 muestra la estructura conceptual básica de un estudio experimental.⁽⁷¹⁾

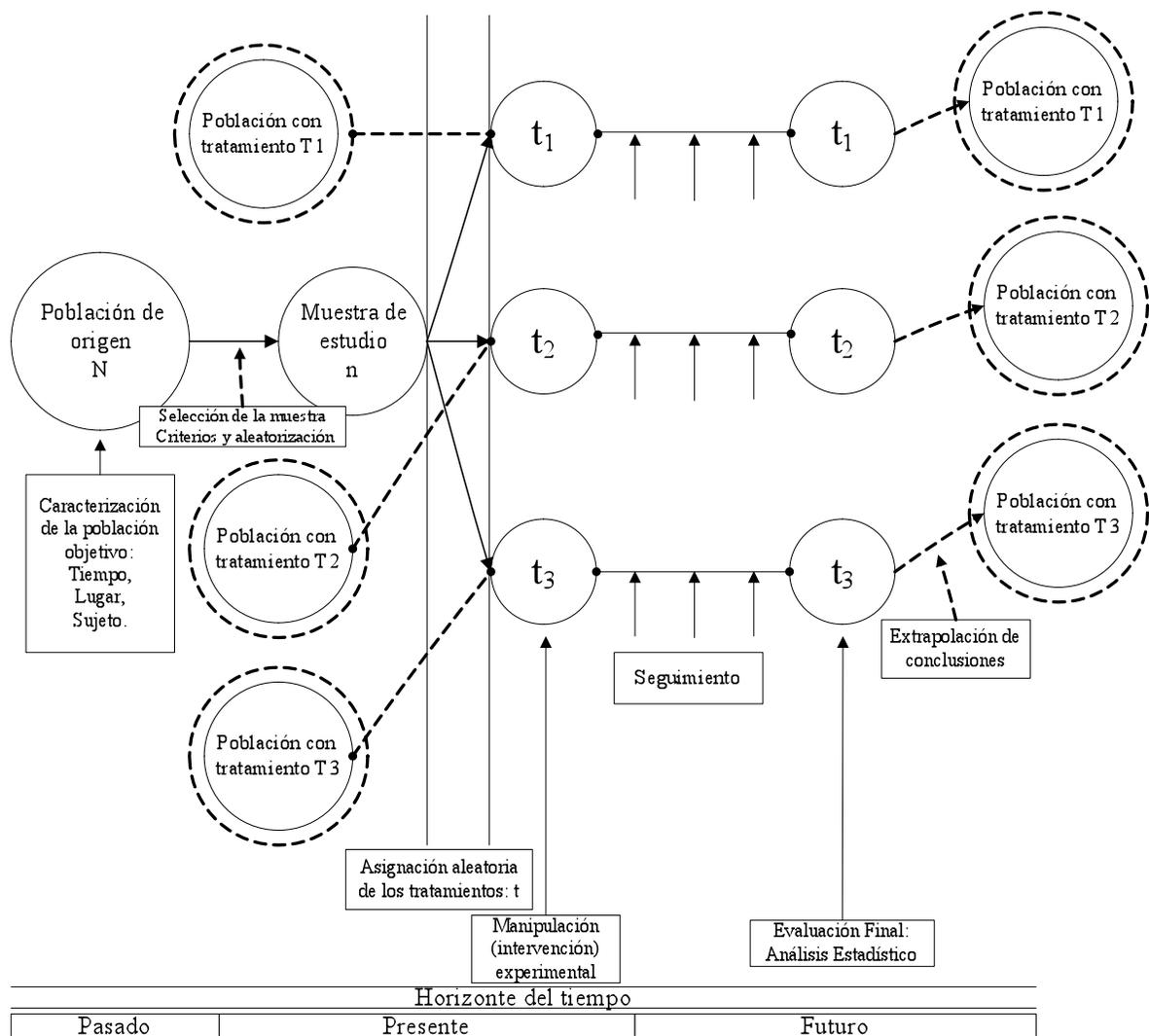


Figura 7. Modelo conceptual de un experimento, propuesto por (Mendez & et.al., 1986).⁽⁷¹⁾

Los diseños experimentales básicos contrastan dos o más condiciones experimentales, representadas por paradigmas.

11.3.1 Paradigmas de diseños experimentales básicos

Patrón clásico pretest posttest con grupo de control negativo:

$$R \begin{matrix} \chi \\ \chi \\ \chi \end{matrix} \begin{matrix} \text{O} & \text{O} & \text{O} & \text{X} \\ \text{O} & \text{O} & \text{O} & \text{—} \end{matrix}$$

Patrones comparativos.

Se compara un grupo experimental (expuesto: X) con otro de control, (no expuesto: '—'). El grupo experimental está sujeto al tratamiento y el de control es aislado de toda influencia del mismo. Los tratamientos son asignados aleatoriamente (R) a las *ue* antes de la exposición. Ambos grupos son evaluados antes y después de la intervención, lo que garantiza la distribución homogénea del error y la validez interna del diseño.

Con observación sólo después de la exposición.

Dos tratamientos experimentales sin grupo de control. Comparan el efecto de dos tratamientos entre sí. Aunque sólo se realizan observaciones después de la exposición, la posible heterogeneidad entre los grupos disminuye por la asignación aleatoria de los tratamientos, lo que garantiza validez interna, o se podría controlar introduciendo una covariable en el análisis estadístico. Este diseño ejemplifica estudios comparativos pequeños de dos grupos ya sea para dos niveles de un tratamiento o para distintos tratamientos, sin grupo de control.

Grupo experimental 1: — X₁ O_{X1d}
 Grupo experimental 2: — X₂ O_{X2d}

Un tratamiento experimental con grupo de control positivo (tratamiento convencional).

Grupo experimental: — X O_{Xd}
 Control positivo: — C O_{Cd}

Patrón de tratamientos múltiples: Múltiples tratamientos (grupos experimentales) con o sin grupo de control.

Grupo 1: — X₁ O_{X1d}
 Grupo 2: — X₂ O_{X2d}
 Grupo 3: — X₃ O_{X3d}
 ⋮
 Grupo k: — X_k O_{Xkd}

Con observación antes y después de la exposición.

Dos tratamientos experimentales sin grupo de control.

Grupo experimental 1: OO_{X1d} X₁
 Grupo experimental 2: OO_{X2d} X₂

Dos tratamientos experimentales con grupo de control negativo.

Grupo experimental 1: $00_{\overline{cd}} X_1$

Grupo experimental 2: $00_{\overline{cd}} X_2$

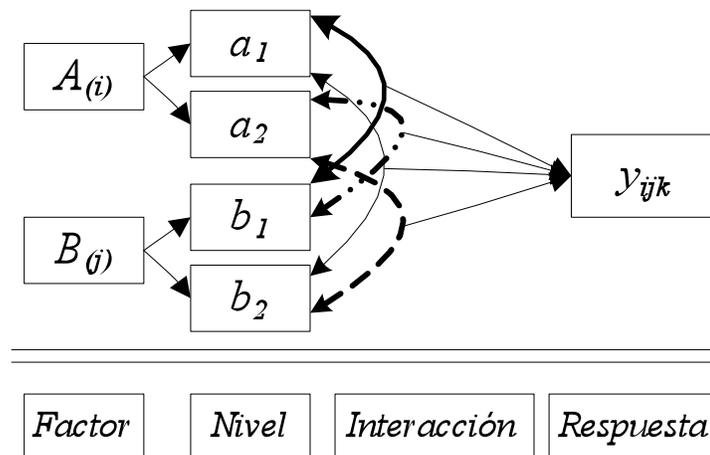
Control negativo: $00_{\underline{cd}}$

Comparación de múltiples grupos: Un tratamiento experimental con grupo de control negativo y grupo placebo.

Grupo experimental: $00_{\overline{cd}} X_1$

Control negativo: $00_{\underline{cd}}$

Grupo placebo: $00_{\overline{cd}}$



Diseños de Experimentos en Arreglos Factoriales.

Estudian el efecto de dos o más intervenciones (*factores*) en el mismo ensayo, por medio de sus niveles (indicadores). El efecto simultáneo de dos o más factores produce una interacción, cuyo orden es igual al número de factores que se combinan, menos 1. Cada *factor* es una *dimensión* del diseño, el cual puede tener dos (A, B), tres (A, B, C) o más dimensiones (n), y cada una, dos o más niveles. La combinación de los *niveles* forma el total de tratamientos (t) posibles del estudio. Si estos tienen igual número de repeticiones (r) el diseño será balanceado. El número de efectos que se pueden analizar en un diseño con n factores es igual a: $2^n - 1 = 2^3 - 1 = 7$ con: $2^{(n-1)} = 2^{(3-1)} = 4$ interacciones. Con tres factores: (A | $i: 1, 2, \dots, a$; B | $j: 1, 2, \dots, b$; C | $k: 1, 2, \dots, c$) habrá tres *efectos principales*, $C_1^3 = 3 : (A, B, C)$,

tres interacciones de primer orden $C_2^3 = 3$: (A*B, A*C, B*C) y una interacción de segundo orden, $C_3^3 = 1$: (A*B*C) (Fig. 8).

El tamaño de un experimento factorial balanceado, completo (los efectos principales y todas las interacciones), es igual al número de tratamientos ($t = abc$) por el número de repeticiones ($l: 1, 2, \dots, r$): así, un diseño balanceado de tres factores, completo, tendrá: $N = abc \cdot r$ sujetos experimentales. Un diseño de dos factores (A, B) con dos niveles cada uno (a_1, a_2 ; b_1, b_2 , respectivamente) tendrá una dimensión 2×2 ; sólo habrá una interacción de primer orden (A*B) y cuatro tratamientos ($a_1b_1, a_1b_2, a_2b_1, a_2b_2$). Si en el análisis estadístico la interacción resulta significativa, ya no se explican los efectos principales independientemente (aunque también lo hayan sido); de lo contrario, se evalúan independientemente los efectos principales. Esto significa que el efecto de un nivel de alguno de los factores, cambia a través de los niveles del otro.

En un ensayo factorial 2×2 , para determinar si el tratamiento con aspirina (dosis alta y placebo) y β -caroteno (dosis alta y placebo) previenen enfermedad cardiaca coronaria y/o cáncer, respectivamente, se distribuyen aleatoriamente N pacientes susceptibles en 4 tratamientos (aspirina, β -caroteno, aspirina* β -caroteno, placebo) y se evalúa si la interacción aspirina* β -caroteno es significativa o si cada fármaco actúa independientemente del otro. Si la combinación es efectiva, quiere decir que ésta previene los casos de enfermedad cardiaca coronaria y/o el cáncer, no siendo necesario explicar el efecto de cada fármaco por separado.

El Modelo Estadístico de un diseño en arreglo factorial, completo, de dos factores es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \left\{ \begin{array}{l} i=1,2,\dots,a: \text{Factor A.} \\ j=1,2,\dots,b: \text{Factor B.} \\ k=1,2,\dots,r: \text{Repetición.} \\ \varepsilon_{ijk, ID} \sim N(0, \sigma^2) \end{array} \right.$$

Donde:

y_{ijk} : Respuesta del k-esimo sujeto en el i-esimo nivel de A y j-esimo nivel de B.

I : Promedio general.

α_i : Efecto del i-esimo nivel del factor A.

β_j : Efecto del j-esimo nivel del factor B.

$(\alpha\beta)_{ij}$: Efecto de la interacción entre A y B.

ε_{ijk} : Error aleatorio de la k-esima respuesta en el i-esimo nivel de A y el j-esimo nivel de B.

Situaciones comunes en las que se aplica la estructura básica de dos grupos:

Tratamiento (X) contra nada (control negativo o ‘no intervención’).

Tratamiento contra un placebo (P: tratamiento de efecto inerte).

Tratamiento (nuevo: X_1), contra otro (convencional, estándar o control positivo: X_2).

*Tratamiento (X), contra el mismo tratamiento más un elemento adicional (XA).
Tratamiento a dosis (duración o intensidad) específica, contra él mismo a mayor dosis (o mayor duración o intensidad).*

Tratamiento actual (en el momento presente), contra él mismo aplicado posteriormente (ensayos correlacionados de tipo “antes-después”); sólo en participantes que experimentan cierto evento (terapia adyuvante de cáncer, contra tratamiento sólo en casos recurrentes).

Ensayos cruzados. Experimento en el que cada sujeto sirve como su propio control. A cada uno se le administra, primero un tratamiento, luego se les “cruza” para recibir un segundo tratamiento, y tal vez subsecuentemente son cruzados para recibir un tercero o cuarto, o el primer tratamiento. Después de aplicado el tratamiento se realiza el seguimiento y, antes del cruzamiento, se puede dejar un periodo de descanso o lavado, lo que evita la influencia del efecto residual del tratamiento previo sobre el efecto del siguiente. El diseño se puede aplicar comparando dos grupos y al hacer el cruzamiento se intercambian los tratamientos entre los grupos.

11.4 Tipos de Diseño Experimental

Existe una gran variedad de diseños experimentales. Los siguientes, son los más utilizados en la experimentación con animales.

11.4.1 En Paralelo

Este es el diseño experimental más común y tiene tanto fortalezas como debilidades. La figura 9 ilustra 3 grupos de ensayo en un diseño en paralelo. Las cajas representan los tres grupos, y todos inician al mismo tiempo. Las flechas muestran la recolección de muestras, las “xxxxxx” denotan el periodo preliminar. El régimen del ensayo (1) involucra que la aplicación de la prueba ocurre al final del estudio, en el régimen (2) al comienzo y al final del estudio y en el (3) lo mismo en el (2), pero con un periodo preliminar o un estudio piloto.

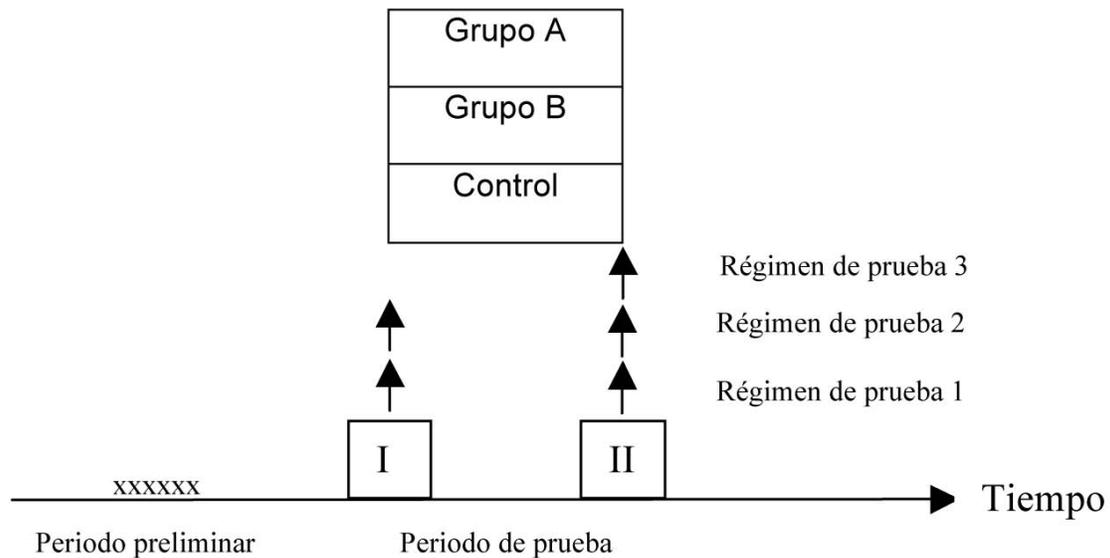


Figura 9. Diseño de grupo en paralelo.

Los resultados de los grupos pueden ser independientes.
 Terminan e inician al mismo tiempo.
 Estadística sencilla, y fácil cálculo del tamaño del grupo.
 Ampliamente usado.

Desventajas:

Los grupos al inicio del estudio (o en el punto inicial I), posiblemente no sean comparables, así como la aleatorización y la estandarización.

La variación intra-sujetos y entre-sujetos puede ser grande y por lo tanto requiere grupos grandes. El régimen 2 hace posible reducir la variación intra-sujetos y entre-sujetos, produciendo una diferencia entre las mediciones en el punto I (inicio) y en el punto II (final). El régimen 3, con un periodo en curso, es utilizado para reducir la variación entre individuos aún más.

El tamaño del experimento puede dificultar el estudio.

La información obtenida del experimento (resultados) es pequeña comparativamente con la cantidad de información aportada para obtener dichos resultados.

EVALUACIÓN

Se deben evaluar otros diseños, o la hipótesis debe desarrollarse de tal forma que haga posible el uso de otros diseños. Se toma en cuenta si las mediciones repetidas pueden reducir aun más la variación intrasujetos y entresujetos.

11.4.2 En Bloques

Con este diseño, los animales se colocan en bloques, partiendo de la base de un criterio para el agrupamiento, previamente establecido. Cada bloque puede formarse por edad, sexo o parentesco. Dentro de cada bloque se utiliza un diseño en paralelo.

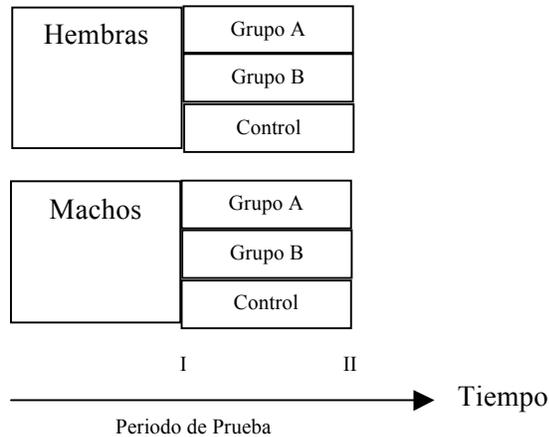


Figura 10. Diseño en Bloques

La figura 10 muestra un diseño en bloques basado en sexo. Un diseño en bloques puede tener muchos niveles de bloques. Por ejemplo los bloques se pueden aplicar a dos líneas consanguíneas.

Ventajas

- Es mucho más probable obtener grupos inicialmente comparables que en el diseño anterior.
- Los resultados de los grupos pueden ser independientes.
- Inicio y término al mismo tiempo.
- Diseño razonablemente sencillo.

Desventajas

- El experimento puede ser complicado.
- Mayores requisitos para aleatorización.
- Definir los bloques puede ser un problema.
- Debe esperarse influencia de los bloques sobre el resultado.⁽⁵⁴⁾

11.4.3 En Bloques Aleatorios

Cuando las unidades experimentales no son todas iguales, se comprende fácilmente que este hecho pueda enmascarar los verdaderos efectos de los tratamientos. El diseño de bloques aleatorios permite soslayar en parte la heterogeneidad de las unidades experimentales, razón por la cual es el diseño fundamental en muchos tipos de investigación. Combina tres características importantes:

Utilidad
Simplicidad
Flexibilidad

La heterogeneidad de las unidades experimentales no se refiere a su aspecto exterior, sino a sus diferencias intrínsecas para reaccionar de distinta forma a los tratamientos experimentales. Por tanto, el concepto de heterogeneidad no es absoluto, sino que depende del experimento que se esté realizando. El sexo, la raza, la edad, la condición física, la situación sanitaria, etc. pueden ser o no en sí mismos fuentes de heterogeneidad, dependiendo de la naturaleza del propio experimento. No obstante, en muchos experimentos biomédicos sí suelen serlo, por lo que hay que tenerlos en cuenta en el diseño experimental.⁽⁵⁷⁾ Los bloques aleatorios, en algunas ocasiones, ayudan a eliminar la variabilidad, debido a otras variables espaciales y temporales incontrolables, y por lo tanto, incrementan el poder estadístico, de esta manera se necesitan pocos animales.⁽¹⁷⁾ Para llevar a cabo el diseño en bloques aleatorios se requiere de dos etapas:

1. Reunir las unidades parecidas para formar un grupo homogéneo. El grupo así formado recibe el nombre de bloque. Un bloque es un conjunto de unidades experimentales que son homogéneas, o por lo menos más homogéneas que el grupo primitivo antes de ser clasificado.
2. Asignar los distintos tratamientos a los animales de forma aleatoria dentro de cada uno de los bloques.

En un diseño de bloques aleatorios, como se muestra en la figura 11, no hay restricción alguna en el número de tratamientos a comparar, ni en el número de bloques que se introduzcan. Esta flexibilidad permite la aplicación de bloques aleatorios en un gran número de situaciones experimentales. Sin embargo, si el número de tratamientos es muy grande, es difícil encontrar bloques suficientemente homogéneos, por lo que el tamaño del bloque estará más limitado por la naturaleza del experimento que por cualquier razón teórica. Esto es, siempre que las circunstancias lo permitan, en experimentos pequeños es muy recomendable utilizar bloques al azar.

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Bloque 1	@ @ @	® ® ®	§ § §
Bloque 2	© © ©	∞ ∞ ∞	æ æ æ

Figura 11. Esquema para tres tratamientos realizados en dos semanas distintas (bloques) ⁽⁵⁷⁾

11.4.4 “Cross-over” Cruzado

En muchas experiencias realizadas en el campo de la biomedicina, el número de tratamientos que hay que contrastar suele ser bajo. Estos diseños, en dichas ocasiones, pueden ser útiles. Tienen numerosas variaciones y solo se comentarán los más básicos y sencillos. ⁽⁵⁷⁾

Este es el diseño de grupo más sencillo, en donde los animales reciben un número de tratamientos en periodos sucesivos. La unidad experimental será entonces el animal dentro de cada periodo de tiempo, así que cada animal puede ser muchas unidades experimentales.

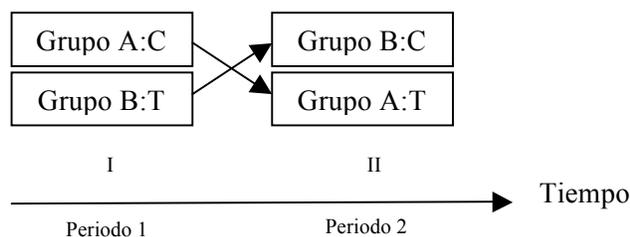


Figura 12. Diseño “Cross-over”

La figura 12 muestra el diseño cross-over más sencillo, donde los animales en los dos grupos de inicio (grupos A:C = controles; Grupo B:T = animales en tratamiento) después de una pausa en el punto I son probados de la misma manera que el otro grupo de inicio. La pausa, que es el periodo de “lavado”, debe resultar en el regreso a una condición, en el animal, lo más cercana posible a la que tenía antes del tratamiento. ⁽⁵⁴⁾

Cuando cada uno de los individuos se emplea como un bloque, el orden de los tratamientos se establece al azar, pero ha de haber el mismo número de individuos que reciban los tratamientos propuestos, suponiendo que son tratamiento *a* y *b*, deben existir animales con la secuencia *ab* y *ba*. A esto se le denomina intercambio, la aplicación de dos secuencias diferentes de tratamientos a dos individuos o grupos. ⁽⁵⁷⁾

Ventajas

Se necesitan menos de la mitad de los animales requeridos que en el diseño de grupos en paralelo. El mismo número de animales da el doble de unidades experimentales y además, la variación intra-entre individuos, se reduce al inicio de cada experimento.

Cada animal está bajo su control.

Y como resultado, el diseño puede ser utilizado para variables más subjetivas, tales como el comportamiento.

Desventajas

Efectos remanentes, por ejemplo, que el periodo de lavado no haya resultado en un regreso completo a la condición original. Esto puede tener una influencia, siempre y cuando no sea significativa, si la media de los grupos de tratamiento se cruzan con otro durante el experimento.

Presentación más detallada de los datos y procedimientos estadísticos. Los efectos remanentes pueden ser contabilizados con un análisis de regresión múltiple (esto aplica especialmente para el diseño cross-over (transversal) múltiple).

El experimento puede llevar mucho tiempo, tan largo que posiblemente cambie la fisiología del animal, por alguna razón tal como la edad o la madurez sexual.

Es sensible a la baja o pérdida de unidades, ya que el diseño tiene una mayor demanda sobre los mismos grupos.

Es compatible para procedimientos que tienen un efecto temporal en el animal y para animales más longevos.⁽⁵⁴⁾

Variantes

El **cuadro latino** y el **greco latino** son variantes del diseño “cross-over”, en los cuales las unidades experimentales son bloqueadas por dos o tres criterios respectivamente y los tratamientos son asignados aleatoriamente a todos los bloques, de modo que cada bloque resultante recibe todos los tratamientos, aunque no necesariamente en el mismo orden. Se denominan diseños cuadrados porque existe el mismo número de tratamientos que de bloques. Estos diseños tienen las mismas ventajas y desventajas del diseño transversal. El análisis estadístico es complejo y son muy sensibles a la baja o pérdida de unidades. Los cuadrados latinos con menos de 5 tratamientos (y por lo tanto con 5 periodos de lavado entre ellos) tienen poco poder estadístico. El diseño puede llevar mucho tiempo. La ventaja con estos dos diseños es que muy poco material puede producir mucha información, y que el cross-over repetido reduce el efecto de la edad y el experimento al largo plazo.⁽⁵⁴⁾

El cuadrado latino consiste en esencia en un bloqueo en dos dimensiones. Cuando existen dos factores que actúan de forma independiente sobre todas las observaciones podemos hacer un bloqueo respecto a uno de ellos, para a continuación bloquear el otro factor. La Figura 13 corresponde a un cuadro con filas (horizontales) y columnas (verticales), cada una de las cuales tendría la condición de bloqueo. El problema consiste en la forma de repartir los tratamientos. Como ejemplo, tenemos un diseño con cuatro bloques fila y cuatro

bloques columna en los que queremos repartir cuatro tratamientos (a,b,c,d). En total tenemos 16 unidades experimentales y se tienen que hacer cuatro repeticiones por cada uno de los tratamientos. Los tratamientos se asignan aleatoriamente a las cuatro unidades de un bloque. Como cada fila es un bloque, por lo tanto cada fila de cuatro unidades deberá tener a, b, c, d en un orden cualquiera. Esta doble división en bloques de las unidades y la correspondiente asignación aleatoria de los tratamientos con la doble restricción del bloqueo, recibe el nombre de cuadrado latino.

a	b	c	d
b	a	d	c
c	d	b	a
d	c	a	b

a	b	c	d
b	c	d	a
c	d	a	b
d	a	b	c

a	b	c	d
b	d	a	c
c	a	d	b
d	c	b	a

a	b	c	d
b	a	d	c
c	d	a	b
d	c	b	a

Figura 13. Cuadro latino ⁽⁵⁷⁾

El diseño de cuadro latino presenta ventajas y desventajas obvias. Es una forma perfeccionada de distribuir las unidades experimentales en bloques, controlando mejor su heterogeneidad y por ello disminuyendo el error experimental. El inconveniente que tiene es que el número de tratamientos que hay que probar tiene que ser igual al número de repeticiones (filas o columnas) que se introduzcan. Otro inconveniente es que los cuadrados latinos suelen adolecer de falta de potencia estadística. Es un diseño útil para reducir el número de animales a utilizar en el campo de la experimentación biomédica. ⁽⁵⁷⁾

El **cross-over múltiple** con dos grupos es una variante muy importante en experimentos con animales. El esquema de la Figura 13 es repetida una o muchas veces, tal que los grupos se alternan entre ellos, siendo grupo de ensayo y control cada vez. De esta forma es posible lograr una medición para conocer si el periodo de lavado, entre cada experimento, ha resultado en un completo regreso a las condiciones originales. Esto se puede utilizar para calcular un efecto índice, sin meternos en éste.

11.4.5 Factorial

Una característica de este diseño, es que el efecto de dos o más tratamientos u otros efectos, son estudiados al mismo tiempo. El diseño factorial es muy utilizado en investigación agrícola y en otras áreas técnicas.

Es muy desafortunado que los investigadores estén enseñando solamente a variar un factor. Por el contrario, los experimentos que son dirigidos para investigar la asociación entre dos o más factores, son muy efectivos en el uso de las fuentes experimentales. Esta declaración está hecha bajo la suposición de que los experimentos están detalladamente planeados y correctamente analizados.

Cepa/línea	NMRI	C57BL/6	Balb/C	CB6F1
Vacuna 1	2 Animales	2 Animales	2 Animales	2 Animales
Vacuna 2	2 animales	2 Animales	2 Animales	2 Animales
Vacuna 3	2 Animales	2 Animales	2 Animales	2 Animales
Vacuna 4	2 Animales	2 Animales	2 Animales	2 Animales
Grupo control	2 Animales	2 Animales	2 Animales	2 Animales

(a) Total: 40 animales, 10 de cada cepa, 8 en cada grupo de vacuna

Cuadro 1. Diseño Factorial (a)

Una de las características más importantes del diseño factorial, es que hace que los resultados de la investigación sean más generales, sin que incremente el tamaño del experimento. En el ejemplo del Cuadro 1, en el que se usó la *ecuación de recursos* para la estimación del tamaño, se probaron cuatro vacunas en cuatro cepas de ratón. La inclusión de la cepa de ratón es una variable extra en el experimento que no aumenta su tamaño. Sin embargo, obtendremos mucha más información.⁽⁵⁴⁾ Los diseños factoriales se pueden utilizar, por ejemplo, para incorporar ambos sexos y/o más de una cepa de animales, sin incrementar el número total de los mismos. Se utilizan a menudo, para equilibrar la demanda de ambos sexos, porque si se parte un grupo de un solo sexo en dos grupos iguales de machos y hembras, no presenta serios problemas estadísticos y tiene la ventaja de poder mostrar si los dos sexos responden de la misma manera.⁽¹⁷⁾

Estos experimentos se pueden conformar por bloques, donde cada bloque es un animal en cada grupo de tratamiento. En el cuadro 1, podemos tener 3 bloques de 20 animales cada uno, por ejemplo, un animal de cada sexo, si no hay diferencia entre las cepas de ratones y el resultado puede ser el mismo que con un diseño en bloque. Sin embargo, si hay diferencias entre la reacción de las cepas de ratones a las vacunas, hemos obtenido información adicional muy importante.

Un diseño en paralelo se puede usar sin bloques. Se sostiene que los bloques son más efectivos. Un diseño factorial simple, también puede combinarse con un transversal, pudiendo complicarse aún más.

El diseño factorial puede ser completo, como se observó, o incompleto. Esto significa que algunos grupos en tratamiento puedan quedar fuera, sin que el experimento se venga abajo. Los programas de análisis de datos, pueden organizar tales diseños, completos o incompletos, y también el correcto plan de análisis estadístico.

Ventajas con el Diseño Factorial

Mejor uso de los animales que con los diseños en paralelo y en bloque.

La estadística no es difícil, es sencillo determinar el tamaño del grupo.

Aporta la base para conclusiones más generales.

Riesgo bajo de sesgo.

Pueden ser evaluadas las asociaciones y las interacciones entre los grupos de tratamiento.

Desventajas del diseño factorial

Más trabajo administrativo.

La interpretación de los resultados de las interacciones puede ser complicada.

EVALUACIÓN

Este diseño es muy efectivo, muy poco utilizado, tanto en experimentos con animales de laboratorio como en experimentos clínicos con humanos.⁽⁵⁴⁾

11.4.6 “Split plot” o de Parcelas Divididas.

En todos los diseños previamente discutidos, la unidad experimental ha sido la misma para todos los factores estudiados. Como ya se ha mencionado, la unidad experimental puede ser un corral o una caja, un animal o la parte de un animal. Sin embargo, en algunos casos, dos diferentes unidades experimentales se pueden utilizar en un mismo experimento. En el ejemplo del Cuadro 2, estamos desarrollando un experimento en toxicología, donde cada caja es la unidad experimental. Además, deseamos probar tres líneas de ratones, con un ratón de cada línea en cada caja; la cual, en este ensayo de toxicidad es llamada la parcela principal, mientras que cada ratón dentro de la caja, es llamado la subparcela. El ratón es la unidad experimental para la prueba de las líneas de ratones.

Ensayo de Toxicidad	Caja 1: Tox +			Caja 2: Tox +			Caja 3: Tox+			Caja 4: Control			Caja 5: Control			Caja 6: Control		
Cepa ^a	C	B6	F1	C	B6	F1	C	B6	F1	C	B6	F1	C	B6	F1	C	B6	F1
uet ^b	1			2			3			4			5			6		
uer ^c	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

^a C= Balb/C, B6= C57BL6, F1= CB6F6 híbrido de Balb/C y C57BL6

^b uet= Unidad experimental para el ensayo de toxicidad; parcela principal, 6 unidades= número de cajas

^c uer= unidad experimental para el ensayo de las cepas de ratones, sub parcela, 18 unidades= número de animales (Dag Marcus)

Cuadro 2. Diseño “Split plot” o de parcelas divididas

Ventajas con el diseño Split plot

Puede usar mejor el material en experimentos especiales.

Los efectos dados por las subparcelas pueden medirse con mayor precisión.

Las mediciones repetidas se pueden tratar como subparcelas.

Desventajas con el diseño Split plot

Los efectos principales de las parcelas, pueden ser imprecisos a causa de la variación de las subparcelas.
Se puede dificultar, en un experimento, la determinación de la unidad experimental.
No siempre es fácil escoger el método apropiado de análisis estadístico.⁽⁵⁴⁾

12. CÁLCULO DEL TAMAÑO DEL EXPERIMENTO

El mérito científico de una investigación se refleja en el diseño o plan de ejecución del estudio y se centra en el marco general de producción, recolección, análisis estadístico e interpretación de datos.

Una vez formulado el problema, se desarrolla un diseño preliminar del estudio, consistente en series de guías sistemáticas del manejo de los datos. Para la ejecución del experimento, se requiere determinar, en la etapa de planeación, el tamaño del estudio, es decir, calcular el tamaño de la muestra (n), lo cual es una cuestión que depende de aspectos metodológicos, estadísticos y éticos.⁽⁶⁶⁾ Resulta indispensable contar con la mínima cantidad y calidad de datos que aporte significación estadística en el análisis y dé validez al estudio.

Metodológicamente, un diseño puede requerir desde un solo sujeto ($n = 1$) o muy pocos, o necesariamente, depender de muestras grandes ($n \rightarrow N$); ambas estrategias tienen ventajas, desventajas y restricciones; su elección depende del objetivo del estudio y de la naturaleza de la medida de efecto que se estudie. Los estudios con uno o con pocos sujetos son, en su mayoría, observacionales y necesariamente largos, requieren estrictos controles de las condiciones de exposición, observación y registro de la respuesta, y múltiples observaciones de su condición antes de la exposición al tratamiento para establecer la *línea base*, como después de ella, para lograr medir la replicación *intrasujeto* (e *intersujeto* en el caso de ser pocos), tener medidas de variabilidad y poder establecer la precisión (y extrapolación) de los hallazgos.

Se opta por un solo sujeto cuando la naturaleza del fenómeno lo exige, como en el seguimiento de cursos clínicos o el estudio de conductas; cuando no existen alternativas factibles o es muy caro obtener la información del experimento, como en los ensayos clínicos con fármacos y en pruebas destructivas o para validar técnicas quirúrgicas de alto riesgo que infligen lesiones permanentes o causan la muerte del animal (aspectos que a su vez tienen restricciones éticas).

En contraste, se requieren estudios grandes para estudiar características con muy baja probabilidad (prevalencia) en la población, o para demostrar que la evidencia observada es altamente significativa desde el punto de vista estadístico ($P < \alpha$). Para ello se requieren conglomerados de cientos o miles de sujetos (inclusive poblaciones grandes), como fue en el estudio de cohorte con intervención de Gran Bretaña para evaluar la salud cardiovascular familiar. Otro ejemplo es el experimento de J. Salk, en el cual se obtuvo evidencia altamente significativa ($P < 0.0001$) de la eficacia de la vacuna contra la poliomielitis, inoculando a más de un cuarto de millón de niños con la vacuna (grupo experimental) y utilizando un grupo de control de casi igual tamaño que el experimental.⁽⁷²⁾

Otro criterio metodológico que influye sobre el tamaño necesario de la muestra es la diversidad del material biológico experimental: a mayor homogeneidad, se espera menor

variabilidad de la respuesta, lo que posibilita realizar ensayos pequeños, por ejemplo, utilizando al mismo sujeto en varias ocasiones (con ciertas restricciones de índole biológica o psicológica) o animales genéticamente homogéneos (líneas puras, consanguíneas, hermanos de la misma camada o gemelos idénticos).

El problema de las muestras grandes se puede reducir estratificando la población de origen en grupos suficientemente homogéneos, y seleccionando aleatoriamente de ella sólo unos cuantos sujetos para el experimento. La estratificación a partir de bloques, asignándolos aleatoriamente en grupos o sub-grupos de animales, disminuye la variación global. Sin embargo, debe restringirse, hasta donde sea posible, aleatorizar pocos conglomerados; asimismo, evitar que los grupos se *contaminen, transmitiéndose* información (de la exposición) entre ellos, o que los mismos experimentadores la transmitan entre los grupos o entre ellos, ya sea por aplicación incorrecta de la metodología o por conocimiento previo de los tratamientos. Esto se debe controlar por *cegamiento* simple o doble del estudio, inclusive cegando al analista de los resultados. El cegamiento evita el sesgo en los resultados y en su análisis. Después de la asignación aleatoria de los tratamientos a las unidades, los animales, las muestras y los tratamientos deben ser codificados hasta que los datos sean analizados. El mismo personal que mide o registra los resultados, y aún el mismo analista de los datos, deben estar cegados a los tratamientos para evitar sesgo en la interpretación.⁽⁶²⁾

Los argumentos *éticos* que subyacen a la experimentación con animales, cuestionan fundamentalmente *si es necesario usar animales y con qué propósito*. En el Reino Unido, está prohibido usarlos en pruebas de inocuidad de cosméticos y de otros ingredientes, aunque generalmente se acepta su uso si el beneficio médico resultante se justifica y es amplio.⁽⁷³⁾ Desde el punto de vista ético, la existencia de *alternativas*, el *valor de los resultados* del experimento y las *implicaciones* para la salud humana y animal son los principales determinantes del tamaño de la muestra para el experimento.

Un criterio ético crucial (3ºR) es utilizar el mínimo número posible de animales que aporten información suficiente y precisa del fenómeno que se estudia.⁽⁶⁶⁾

Algunos autores proponen varios criterios y estrategias de reducción:

Criterios:

Aplicar procedimientos que *reduzcan el número necesario* de animales, con el cual se cumplan las necesidades esenciales del humano y de los mismos animales.

Usar el *mínimo absoluto requerido* para lograr los objetivos experimentales.

Usar el *mínimo suficiente* de animales para dar poder estadístico adecuado a la respuesta de la pregunta de investigación.

El concepto de reducción implica el desarrollo de formas de obtener niveles comparables de información del uso de menos animales, o de obtener más información a partir de un número dado de animales, tal que se necesiten menos de ellos para completar el proyecto de investigación.⁽¹⁷⁾

Estrategias: niveles de enfoque:

Extra-experimental (Nivel inicial). Su metodología consiste en:

Apego a las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), Buenas Prácticas de Manejo (GMP) y Buenas Prácticas de Investigación (GIP).

Armonización (Congruencia) de las guías de investigación.

Diseñar y aplicar nuevas estrategias de investigación.

Diseñar nuevas estrategias de producción.

Supra-experimental (2° nivel, dependiente del Extra-experimental).

Metodología:

Educar y entrenar al personal de investigación.

Revisar y aplicar postulados éticos en la experimentación con animales.

Reducir el excedente de progenitores de la colonia.

Re-evaluar las especificaciones de los animales experimentales.

Re-usar los animales y promover los estudios longitudinales.

Intra-experimental (3° nivel, dependiente del Supra-experimental). Emplear metodología de experimentación innovadora en:

Diseño experimental.

Exploración aleatoria.

Estudios piloto (preliminares).

Análisis retrospectivos.⁽⁷⁴⁾

La reducción del tamaño de la muestra se puede lograr empleando diseños más eficaces, comparando distintos grupos experimentales (tratamientos) contra un mismo grupo de control, combinándolos en el experimento, ya que no se pueden comparar tratamientos entre sí como cuando son agrupados y la comparación de los tratamientos contra controles separados requiere más animales. Por otra parte, *usar demasiados animales en un experimento es no ético, como tampoco lo es usar muy pocos, ya que muchos experimentos pueden fallar y deben ser repetidos en más animales.*

Muchos bioensayos practicados en grandes especies usan tan pocos animales, que no es posible hacer ningún análisis estadístico de los resultados, o bien, se calculan estimadores distintos de los necesarios para los contrastes estadísticos, siendo cuestionable la validez científica del ensayo y perdiéndose los animales.

Sin embargo, aunque tales estudios no son aceptables como experimentos individuales, se pueden justificar si son parte de una serie de experimentos, por ejemplo, para evaluar seguridad. Los estudios pequeños se pueden justificar cuando sólo se necesita información descriptiva, pero no significación estadística, o bien, como estudios piloto. No obstante, existe la tendencia a aumentar o a disminuir el número de animales para un experimento, con base en argumentos científicamente irrelevantes como el costo o la disponibilidad, sobreponiéndolos a las consideraciones estadísticas.

No se debe interpretar como un obstáculo a la investigación el hecho de que los comités de ética requieren la justificación del investigador sobre el tamaño de la muestra de animales en sus protocolos experimentales. Tampoco debe tomarse como motivo de conflicto la exigencia de los miembros del comité de reducir la muestra, con el deseo subjetivo de usar *pocos animales*, sino que se debe prevalecer el principio de usar *el mínimo necesario para tener significación estadística.*

Las justificaciones descritas para determinar el tamaño de la muestra necesaria en un experimento, exigen usar criterios estadísticos con base en las expectativas del valor científico de los resultados del estudio, para lo cual se requiere determinar el poder y la significación de los hallazgos y prever las implicaciones de las conclusiones.

13. CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para calcular el tamaño de la muestra de un estudio, se puede aplicar un procedimiento similar al del diseño de un ensayo clínico:

Recolectar información relevante de los parámetros de interés (antecedentes o ensayos preliminares) con base en el problema de investigación.

Definir la población de estudio (de origen) sobre la que se emitirán las conclusiones.

Establecer criterios y procesos de selección de la muestra (reclutamiento de unidades), duración y frecuencia del seguimiento, tiempos de falla (muerte, abandono, eliminación), y punto final del experimento.

Establecer la variable de respuesta, su escala de medición y la precisión deseada⁸.

Formular el modelo estadístico y la estructura del diseño del experimento: factores, repeticiones, bloques, asociación, uni- o multivariable, mediciones por unidad (longitudinal, antes-después, repetidas).

Considerar rangos esperados de los parámetros, las tasas de eventos, pérdidas de seguimiento, riesgos y apego al tratamiento (ensayos clínicos con fármacos).

Calcular el tamaño de la muestra para un rango aceptable de los parámetros, considerando:

- A. El tipo de estudio: descriptivo, comparativo, asociación, transversal, longitudinal, experimental.
- B. El número de parámetros por evaluar: uno, dos o más.
- C. El parámetro por estudiar: promedios, proporciones, varianzas, razones, riesgos, diferencias o cocientes.
- D. Las hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_A) asociadas al modelo estadístico.
- E. La significación (α) y el poder deseados ($1 - \beta$) de la prueba, que implican: la diferencia mínima significativa deseada y la regla de decisión del rechazo de H_0 .

⁸ Estadísticamente, la precisión (confiabilidad) es la aproximación que se espera tenga un estimador muestral respecto del parámetro relevante de la población objetivo, el cual, en la práctica, es necesariamente un valor estimado, ya que generalmente es desconocido. dependiendo del estadístico en cuestión y del modelo estadístico en el que se basa la prueba, la precisión puede o no depender directamente de la unidad de medición, del valor de la población y de la forma de la distribución de la población. sin embargo, *siempre* depende del tamaño de la muestra, misma que a su vez depende del error estándar del estimador: $s_z = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$ el

cual es una forma convencional de medir la precisión de un estadístico (Cohen, 1977).

Graficar curvas de potencia conforme al rango de parámetros y valores razonables.⁽⁷⁵⁾

No existe una regla universal para calcular el tamaño necesario de la muestra para un experimento.⁽⁷⁴⁾ De los métodos más comunes, el *método por cálculo del poder* (estadístico) de la prueba y la “*ecuación de recursos*” de Mead son los más empleados, aunque ninguno es totalmente satisfactorio; se recomiendan como guías, pero no son definitivos, ya que ninguno considera el costo de las unidades experimentales o el costo de llegar a conclusiones incorrectas. El *método por cálculo del poder* se considera más confiable, ya que el poder de una prueba estadística es la probabilidad de que producirá resultados estadísticamente significativos. “*La ecuación de recursos*” de Mead incorpora el efecto de tratamiento, el efecto de bloque y los grados de libertad del error.⁽¹⁸⁾

El método de cálculo de poder es apropiado para experimentos caros, relativamente simples, en los que no se observan diferencias significativas o el objetivo del estudio es no encontrar efecto alguno. Este método se basa en obtener muestras del tamaño para cierta *potencia*, lo que significa que el efecto observado sea debido al tratamiento y no por coincidencia. Utiliza la relación matemática entre la direccionalidad de la prueba, el tamaño del efecto de interés, la desviación estándar, el poder requerido, el nivel de significación y el tamaño de la muestra. Hay diversas fórmulas que utilizan estos elementos, sin embargo, su aplicación también depende de la naturaleza de los datos (discretos o continuos), del tipo de prueba estadística que se va a hacer y del número de tratamientos en el experimento.

Como sugerencia, si no se tiene idea de la dirección que puede tener la respuesta del estudio, se eligen contrastes bilaterales: si se espera encontrar un efecto (diferencia) grande la muestra será pequeña; si se desconoce la desviación estándar, se puede obtener de un estudio piloto o de la literatura; se debe tener una expectativa de la capacidad para detectar el tamaño de efecto requerido y que éste sea importante a una significación estadística dada. Todos estos elementos se introducen en una fórmula

Para hacer inferencia estadística es necesario especificar cuatro parámetros: i) el *poder*: $(1 - \beta)$, ii) la *significación*: (α) , iii) el *tamaño del efecto* y iv) el *tamaño de la muestra*: n ; todos ellos interrelacionados. Cuando en una prueba se anticipa cierto tamaño del efecto, se establece asimismo un criterio de significación y la cantidad de poder deseado, de lo cual se puede determinar el tamaño necesario de la muestra para cumplir con estas tres especificaciones.

13.1 El Poder

Es un concepto poco entendido entre no especialistas y debido a ello se omite con frecuencia en el análisis de resultados. En términos prácticos, el poder de una prueba es *la capacidad de decidir rechazar correctamente una hipótesis nula*, es decir, la hipótesis de que el efecto por demostrar está, de hecho, ausente: que no existe, i.e., la capacidad de la prueba para detectar que la hipótesis alternativa es correcta, cuando ésta es verdadera: es la fuerza para demostrar que el efecto en cuestión existe.⁽⁷⁶⁾

13.2 La Significación

Representa el estándar de prueba de que el fenómeno existe, o el riesgo de rechazar equivocadamente la hipótesis nula. Quizá un poco más respecto al $\alpha < 0.05$

13.3 El Tamaño del Efecto

Es la diferencia estimada entre dos tratamientos: es un valor distinto de cero que discrepa del valor que propone la hipótesis nula. En términos prácticos, para fines de la decisión estadística, mientras más grande sea esta discrepancia, mayor será la evidencia de que el fenómeno en estudio se manifieste, por lo que los investigadores buscan, con las pruebas estadísticas, rechazar la hipótesis nula. Existen programas estadísticos (SAS®, SPSS®, SYSTAT®, JMP®) que consideran diversas situaciones que usan el método del poder para calcular el tamaño necesario de la muestra de un experimento.

14. LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES FUERA DEL LABORATORIO

En los experimentos con animales de granja y en áreas de investigación agrícola, es importante que los investigadores estén conscientes de la necesidad de que su investigación pueda ser reproducida. En una estación experimental estos ensayos pueden realizarse con varios animales en la prueba, y/o con tratamientos asignados al azar. Además, debido a la necesidad de controlar la variación externa, los animales son agrupados, antes de la aleatorización, en términos de ciertas características como son: la raza, número de lactancias, datos de partos anteriores, edad y peso corporal. El diseño a menudo es de bloques completos o de intercambio, cruzado o transversal.

Al proponer un experimento en granja, donde frecuentemente es sólo un animal, o tal vez dos por granja los involucrados, surge la pregunta ¿Es posible tener un solo animal por granja? Claramente se entiende, que el investigador necesita tener varias granjas en el experimento en donde los tratamientos experimentales puedan ser replicados. Sin embargo, entonces los animales a su disposición son probablemente heterogéneos debido a las diferencias en raza, edad, estado de lactación etc. Por lo cual se deben esperar amplias variaciones entre los animales en cuanto a diferencias en la producción de leche, ganancia de peso etc. El manejo a que los animales se someten en cada granja en particular contribuye a la variación entre ellos.⁽⁷⁷⁾

El cambio del proceso de investigación de un ambiente controlado en el laboratorio a condiciones de granja conlleva consideraciones adicionales en el diseño experimental y en la evaluación de los resultados de la investigación. No sólo porque el proceso introduce más factores externos los cuales son difíciles de controlar, sino también porque de forma adicional el granjero y sus prácticas deben ser tomados en cuenta. Se sabe cómo el investigador, la tecnología aplicada, el granjero y las prácticas en las granjas son componentes importantes a tomarse en cuenta en la investigación. Mientras que el investigador hace sus recomendaciones basadas en la evaluación de sus objetivos, de los resultados surgidos y de la metodología utilizada en la investigación, el granjero toma sus decisiones sobre las recomendaciones, principalmente derivado de sus experiencias.⁽⁷⁸⁾

14.1 Tipos de Experimentación en Granjas

La experimentación en animales de granja es a menudo descrita en términos de la importancia para el investigador y el granjero involucrados en el diseño y manejo del ensayo. En muchos experimentos con animales de granja el granjero maneja o tiene influencia en los ensayos. El grado de injerencia del granjero sobre el diseño del estudio y los tipos de medidas dependen de los objetivos de éste.

Un estudio típico permite, por ejemplo, comparar los efectos de un suplemento alimenticio como es un determinado aditivo, en la producción de leche y examinar sus efectos relativos en animales con diferentes números de lactaciones. Adicionalmente pueden plantearse otros objetivos como son: identificar si son las granjas o el suplemento los que tienen el beneficio en particular, y obtener alguna tendencia en la preferencia del granjero. El investigador es por consiguiente el interesado en ambos efectos en conjunto, el aditivo y el efecto del manejo en diferentes subgrupos de animales de la granja. Estos objetivos dictan la necesidad de una variedad de condiciones de la granja y la intención de explorar las variaciones de granja a granja.

Algunos estudios en granja son principalmente socio-económicos. Los datos de producción o crecimiento son de poco interés, y son poco probables de recordar. En cambio lo de interés es la aceptabilidad de la intervención del granjero. Un ejemplo podría ser donde el granjero está dispuesto a promover el crecimiento del zacate Rhodes como suplemento alimenticio en temporada de secas.

De nuevo los objetivos del estudio indican un interés en la variabilidad entre granjas y darle explicación a esto. El investigador, por consiguiente, necesita tratar/cubrir un rango de granjas y las condiciones similares de los animales de su estudio.

Estos dos estudios pueden contrastarse en un experimento en la granja para investigar el efecto del suplemento alimenticio sobre el perfil de progesterona en leche de vacas híbridas locales. Este tipo de estudio sólo puede ser conducido en granjas que tengan la correcta condición biofísica, puesto que una estación animal tiene sólo razas puras como primera condición, de otro modo es similar a una estación de prueba. Los investigadores deben tener control de la variación de granja a granja que será explorada y deben decidir el sitio del estudio en unas pocas y selectas granjas, que sean similares en términos de sus animales, prácticas de manejo etc. Concluyendo, que los resultados obtenidos con este tipo de estudios no puede generalizarse a la población total.

14.2 Opciones de Diseño

Para efectuar estudios en granjas animales y de acuerdo a las necesidades del granjero, hay dos opciones abiertas al investigador, que son extensiones del diseño utilizado en una estación animal: un “diseño entre animales” o un “diseño dentro del animal”. Obsérvese que con sólo un animal por granja, el animal y la granja son intercambiables, identificados como material experimental y ambos utilizados.

14.2.1 Experimentos entre Animales (entresujetos)

Aquí la unidad experimental es el animal de una granja. El tratamiento experimental es asignado al azar para cada granja, así cada animal en el estudio recibe sólo un tratamiento, y hay varias granjas para cada tratamiento específico.

Estos experimentos son relativamente fáciles de diseñar y de operar, sin una real restricción en la duración del tratamiento, el cual puede ser largo o corto dependiendo de las circunstancias.

Hay determinados tipos de experimentación animal que naturalmente se prestan a estudios entre granjas. La investigación de la eficacia de un tratamiento veterinario, o los efectos prolongados de diferentes dietas sobre el mantenimiento de la producción láctea son dos ejemplos.

La desventaja de los experimentos entre animales en el entorno de la granja, es la gran variación de animal a animal. A menos que haya grandes diferencias entre el tratamiento bajo investigación, con sólo un pequeño número de animales en la granja, puede ser difícil demostrar el efecto del tratamiento por encima de esta variación. Consecuentemente, los estudios pueden requerir un amplio número de animales en función de detectar diferencias entre los tratamientos. En cambio el número de tratamientos experimentales bajo investigación pueden ser limitados, a menudo para dos tratamientos simples es posible establecer un tratamiento factorial 2X2.

El tamaño de muestra necesario para estas pruebas está directamente relacionado con la cantidad de la variación entre los animales.

Por lo tanto cuando se planea un ensayo, el investigador debe considerar cómo tratar esta variación con el número de granjas necesarias dentro de la limitación de sus recursos, en tanto que de todas formas necesite un nivel adecuado de precisión en sus objetivos.

Limitando la población de estudio. Al disponer de una, o tal vez dos razas de animales –o al excluir a novillas de primera lactación cuando los animales están mezclados por edades, se puede reducir la variación de animal a animal. Al reducir la población de estudio se obtiene la ventaja de controlar las variables externas, y así contrapesar con las desventajas de los resultados del ensayo, ahora solo relacionado con la población particular de estudio.

Agrupando granjas en “bloques” de granjas similares. Asignar al azar los tratamientos a estudiar en granjas dentro de los grupos, mejora la precisión de los tratamientos investigados. Las granjas pueden ser agrupadas, utilizando una o más características de los animales (ej: raza, edad), la granja (ej: localización, tipo) y/o el granjero (ej: las prácticas de manejo). Si hay sólo dos tratamientos bajo investigación, el abordaje más simple es identificar pares de granjas similares y aleatorizar los tratamientos en cada par de ellas.

14.2.2 Experimentos en los Mismos Animales (Intrasujetos)

En estos experimentos, una secuencia de tratamientos experimentales es asignada al azar para cada animal de la granja. Cada animal recibe un tratamiento por un tiempo determinado y los cambios que se presentan son comparados con otros tratamientos.

La mayor ventaja de los experimentos con el mismo animal, sobre experimentos entre animales es el mejoramiento de la precisión. Puesto que los animales reciben cada uno un tratamiento experimental, la comparación de los tratamientos está basada en las diferencias

observadas dentro del mismo animal. Consecuentemente, la comparación del tratamiento está valorada relativamente en la variación dentro del animal, que siempre es prácticamente mucho menor que la observada entre animales.

El incremento en la precisión de la investigación utilizando el mismo animal redundaría en el uso de menos animales. Esta es una razón atractiva para usarse como un diseño en experimentos animales en granja. Sin embargo existen algunos inconvenientes potenciales con estos diseños:

Estos experimentos tienen mayores posibilidades de “salir mal” que los experimentos entre animales. Por ejemplo, si el periodo de tratamiento es largo, o hay también muchos de ellos, el ensayo en conjunto se prolongará y el granjero perderá interés, por lo cual el ensayo fallará totalmente. Por lo consiguiente, es aconsejable restringir el número de tratamientos a dos o tres, lo cual depende de la duración de cada tratamiento. Existe también la posibilidad de que el granjero se muestre renuente para observar a un animal o para continuar un tratamiento particular una vez que ha observado un temprano beneficio aplicable a su explotación. No obstante, si esto ocurriera, la situación provee información importante acerca de las preferencias del granjero.

Las conclusiones aplicadas en la duración sobre los tratamientos que fueron dados; las cuales no puedan ser extrapoladas más allá. En ocasiones, un ensayo cruzado con periodos de duración de 2 a 3 semanas puede ser apropiado para comparar dietas o cuando se intenta evaluar un alimento adicional durante la temporada de secado de la vaca, pero no pretende utilizarse en la mayor parte del ciclo de lactancia.

Efectos remanentes o residuales. Esto ocurre cuando un tratamiento dado al inicio del experimento tiene un efecto posterior sobre un tratamiento diferente que se está administrando (por ejemplo, falla en el periodo de adaptación o lavado entre los tratamientos). En algunas ocasiones esto se puede controlar incorporando en el experimento periodos de adaptación, por ejemplo, los periodos de depuración o aclaramiento farmacológico. Alternativamente, existen diseños experimentales cuyo análisis posterior ayuda a controlar el efecto remanente. Vale la pena señalar que hay una gran diferencia en los experimentos de intercambio realizados en una granja y en una estación experimental. En los estudios efectuados en una estación experimental los efectos del tratamiento se asume que son consistentes en todos los animales, por lo que el análisis de los datos es relativamente fácil. Sin embargo en la experimentación en la granja, en donde los animales pueden tener diferentes edades, peso, etc. y los granjeros pueden tener diferentes prácticas de manejo, no hay una razón por cual se espere, o se quiera, que el efecto del tratamiento sea el mismo en todos los animales. De hecho, a menudo el interés radica en cómo el tratamiento varía en todos los tipos de granja o animales.⁽⁷⁶⁾

Existe otro punto, relacionado con los diseños de intercambio en los estudios de lactación, en este caso los investigadores se preocupan por un ensayo que tenga muchos periodos que cubran gran parte de la curva de lactación, y en el cual algún efecto del tratamiento sobre la producción de leche pueda disminuir a lo largo del ensayo. Cuando el primer periodo de tratamiento no está tan cerca del parto, es

probable que tal tendencia sea de poca importancia en la granja de experimentación cuando se ven en el contexto dentro de otras granjas y sus variaciones.⁽⁷⁶⁾

14.3 Explicación de la Variación

Como se mencionó antes, en los experimentos en granja, a menudo se está interesado en explorar las causas de la variación entre granjas. Esto significa que es posible identificar las características de la granja, el granjero y los animales; como responsables de los patrones en los datos. Por lo tanto, independientemente de cuál es el diseño utilizado, es importante durante la planeación considerar qué datos auxiliares necesitan ser recolectados antes y durante el ensayo y así determinar qué tipo de análisis de datos es posible.

Estos datos serán utilizados en el análisis subsecuente de tres formas diferentes:

- A. Para explicar algunas variaciones intra e inter sujetos (animales) y así mejorar la precisión con respecto a los objetivos planteados.
- B. Para explorar el comportamiento de diferentes grupos de animales en la granja, tal como estén identificados en los objetivos del estudio.
- C. Para ayudar a explicar hallazgos inesperados, los cuales aparecen en el análisis de los datos.

Los datos recolectados son imágenes del animal, de la granja y del granjero, los cuales se sabe, o se piensa, influyen en la respuesta del animal. Los datos pueden ser características, que pueden ser registradas al inicio del ensayo, como es la localización, tamaño de la granja, o un indicador del desarrollo animal como es la lactación o producción láctea previa. De la misma forma, puede ser información que no se conozca al inicio del ensayo, tal como si el granjero decide alimentar con algún suplemento a los animales durante el ensayo. Este último ejemplo, demuestra no sólo la necesidad de identificar por anticipado qué datos adicionales serán recolectados, sino también la importancia de recolectar información a lo largo del ensayo, aún si no son medidos o contados de manera precisa.⁽⁷⁶⁾

14.4 Número de Granjas Requeridas

El propósito de esta sección es ilustrar, las implicaciones de los recursos para las investigaciones entre animales, así como en el mismo animal, cuando sólo hay uno por granja. Usamos la situación sencilla de que hay sólo dos tratamientos y se asume inicialmente que el objetivo principal es detectar si hay una diferencia entre ellos.

Ejemplo.- Un estudio en un establo con vacas en lactación es realizado en cierta localidad para comparar el efecto de dos tratamientos de forraje sobre la producción de leche.

A= Una dieta control (involucrando pajas)

B= La misma dieta, además un suplemento (3kg/día)

El promedio de la producción de leche determinado en una vaca en esa localidad es del orden de 6-8 kg/día. Se espera que el suplemento mejore la producción de leche en aproximadamente 0.5-0.75 kg/día. Algunos trabajos previos muestran que entre granjas la desviación estándar es aproximadamente de 2.7 kg/día y la desviación estándar del animal es de 0.8 kg/día.

Estos valores de la diferencia esperada por el suplemento y la variación esperada en los datos, provee la información para calcular el tamaño de muestra requerida. El experimento se realiza como un estudio entre animales y requerirá cuando menos 200 animales por tratamiento, dando un total de 400 granjas. Un estudio cruzado podría requerir de 20 a 40 réplicas por tratamiento.

Debido a que cada tratamiento se dará en un animal por cada granja, el investigador generalmente requerirá reclutar unas pocas más, por el caso de que algunos granjeros detengan o interrumpan el estudio después de un tratamiento. Aún así, esta muestra es considerablemente menor que la de un estudio entre animales y por consiguiente el diseño transversal es más indicado para ser utilizado.

14.5 Determinación del Tamaño de la Muestra

La siguiente fórmula para el tamaño de la muestra es apropiada para datos medidos continuamente como la producción de leche o el peso corporal. Esto asegura que, si ahí existe una diferencia real, de cierta magnitud, entre dos tratamientos, el experimento tiene alta probabilidad (aproximadamente 80%) de detectar si estadísticamente es significativa a un nivel de 5%.

$$n = \frac{16 \times \sigma^2}{d^2}$$

En donde n = número de réplicas por tratamiento

σ^2 = Estimado de la varianza (de la unidad experimental)

d = diferencia esperada, a detectarse, entre los tratamientos. ⁽⁷⁷⁾

14.6 Consideraciones Estadísticas

Con la finalidad de aplicar el correcto método estadístico en el análisis de los datos y hacer la inferencia estadística de los resultados, el diseño del experimento debe satisfacer las siguientes condiciones:

El espacio de inferencia debe ser definido. Estos son los límites dentro de los cuales los resultados pueden aplicarse. La definición de un espacio de inferencia determinará un relevante tamaño de muestra a utilizarse.

Las unidades experimentales (ue) deben ser seleccionadas de forma aleatoria. La selección aleatoria es necesaria para proteger contra sesgos en el experimento que pueden ser el resultado de algunos factores desconocidos, teniendo previas influencias en las ue sobre algunos manejos sistemáticos. Cuando las unidades experimentales no son homogéneas, puede ser necesaria la estratificación basada en algunas características propias.

La asignación de los tratamientos en las unidades experimentales también debe ser aleatorizada.

Con la asesoría de un estadístico, debe desarrollarse el modelo matemático del problema a ser estudiado. ⁽⁷⁸⁾

15. PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una presentación adecuada, clara y concisa de los resultados de un trabajo de investigación, es imprescindible para contribuir a la difusión de los mismos, e incluso juega un papel crítico en la aceptación del trabajo en una revista científica seria. Actualmente la exigencia de los revisores de las revistas arbitradas ha contribuido a que el nivel de calidad en la presentación de datos sea cada vez mayor, por lo que es necesario seleccionar adecuadamente la forma en que los datos serán presentados, evitando así errores que ya son considerados inadmisibles. De esta forma, un inicio para orientar la presentación final, pueden ser las propias guías suministradas por las revistas científicas arbitradas.

La forma de presentar los datos es diferente según el tipo de los mismos. En resumen se puede hablar de dos grandes grupos: los datos cuantitativos y los datos cualitativos. En el grupo de datos cuantitativos están comprendidos aquellos cuyo resultado puede variar de forma continua, como es el incremento diario de peso, presión sanguínea, producción diaria de leche, niveles de glucosa sanguínea, etc. y los que sólo pueden formar valores enteros como son: el número de crías por camada, el número de partos por año, el número de colonias bacterianas, etc. Por otro lado las variables cualitativas se dividen en las nominales, que son simples etiquetas como sexo, raza, cepa, característica genética, etc, y las ordinales, en las cuales se da una relación de orden entre las respuestas, como son: los resultados de la relación de un tratamiento con el estado de salud del animal (grave, sin cambios, mejorando), signos relacionados con estados de estrés (lagrimeo, vocalizaciones, inquietud) y signos relacionados con bienestar (lamido, acicalamiento, alimentación). Cada tipo de variable tiene sus propios requerimientos en cuanto a presentación y pruebas que se utilizan para contrastar los valores entre grupos.

Para lograr una adecuada presentación de resultados existen 9 puntos básicos que deben tomarse en cuenta:

Los datos pueden ser presentados en el texto, en una tabla, o cuadros gráficos, o diagramas. Cualquiera de éstos es apropiado para dar información adecuada al lector o espectador, el cual podrá ser capaz de imaginar y asimilar la información que se presenta. Para propósitos de referencia, las tablas son usualmente la única opción adecuada.

El texto de forma única no debe ser usado para comunicar más de tres o cuatro números. Grupos de resultados numéricos pueden usualmente ser presentados como cuadros o gráficos preferentemente incluidos en el texto. Convenientemente, los cuadros y gráficas presentadas pueden brevemente resumir la información que quizá resulte difícil de describir con palabras en el texto. Y de otra forma, cuadros y gráficas mal presentadas, pueden ser confusas e irrelevantes.

Cuando números enteros son presentados en el texto, los números menores o iguales al nueve pueden ser escritos como palabras. Las cifras desde el 10 y mayores deben ser escritas con números. Cuando se citan números decimales, el

número de dígitos significativos puede ser consistente con la precisión justificada por el tamaño de la muestra y la variabilidad del número dentro de ellos.

En general, las tablas son mejores que las gráficas para presentar información estructurada numéricamente, mientras que las gráficas son mejores para indicar tendencias y hacer extensas comparaciones para demostrar relaciones.

Las tablas y las gráficas pueden, idealmente, ser auto explicativas. El lector podrá ser capaz de entenderlas sin detalles referidos en el texto. El lector con conocimientos básicos puede elegir correctamente cosas o sucesos de las tablas o gráficas sin necesidad de leer el texto completo. El título puede ser informativo, y las filas y columnas de las tablas o gráficas deben ser claramente etiquetadas. En otro sentido, el texto debe invariablemente incluir la mención de los puntos clave en la tabla o figura.

La descripción de los números representados en una tabla o cuadros (imágenes), debe hacerse tan simple como sea posible y contener suficientes detalles para ser útil e informativa. Los datos originales son importantes para resumir y hacer claras las mediciones, así, si hay dudas importantes acerca de la definición y las unidades; de donde los datos fueron recolectados. También el grado, extensión y cobertura deben ser claro; de igual manera, el periodo de tiempo representado tiene que ser explícito; y si los datos son obtenidos de otra parte, citar el origen.

La información estadística, por ejemplo: el error estándar adecuado, es usualmente requerida en artículos científicos formales. Esto puede no ser necesario en artículos a publicar en revistas de divulgación. Tal información estadística puede ser representada en una forma que no oculte el mensaje principal de la tabla o gráfica.

La transmisión eficiente de la información debe permitir la rápida y correcta interpretación de los resultados, el ahorro de espacio en los cuadros y las gráficas.

El reporte tabular de los resultados debe apegarse al formato del medio donde se vayan a publicar. Por ejemplo, los cuadros no deben llevar líneas verticales y las notas y los títulos deben ir al pie. Es recomendable seguir las especificaciones de cuadros, figuras, tablas, gráficos y otros elementos del reporte de resultados de acuerdo al medio donde se vayan a publicar éstos.

15.1 Gráficas y Cuadros

Los dos tipos principales de presentaciones gráficas de los resultados de la investigación son las gráficas de líneas y los cuadros de barras. Las gráficas pueden ser pequeñas o, se pueden presentar múltiples trazos en una sola página o pantalla. Las gráficas de líneas suelen mostrar más detalles que los cuadros de barras. Ellas pueden ser utilizadas cuando el eje horizontal representa una cantidad continua, tal como el paso de tiempo después de la aplicación de un tratamiento o la cantidad de fertilizante aplicado para buscar un determinado efecto.

Las gráficas de líneas son útiles para mostrar más de una relación en la misma imagen, por ejemplo la respuesta de un fertilizante sobre tres diferentes variedades de pastos. Aunque esto no es una regla general, las gráficas con más de cuatro o cinco líneas tienden a provocar confusiones, a menos de que las líneas estén bien separadas.

En una gráfica con más de una línea, deben utilizarse diferentes estilos de líneas (gruesas, continuas, discontinuas etc), colores o símbolos (asteriscos, círculos, cuadrados etc.), lo cual permitirá distinguir estas líneas. En un grupo de gráficas de líneas los símbolos y estilos de línea deben utilizarse consistentemente. También debe considerarse usar siempre la misma escala para cada gráfica.⁽⁷⁸⁾

Cuando el eje horizontal es un factor cualitativo, como lo son la raza, cepa, variedad de cultivo u origen de la proteína, es mejor utilizar los cuadros de barras. En este caso, unir los puntos superiores en una línea explica a cuál conjunto de puntos pertenece, pero las líneas por sí mismas no tienen valor interpretativo.

Los cuadros de barras muestran claramente resultados sencillos. Por lo general, éstos no son utilizados para cantidades grandes de información. Cuando el eje horizontal representa una categoría discreta, esto es a menudo no inherente al orden de las barras. En este caso, el cuadro es fácil de leer si las barras son clasificadas en orden: por peso, edad, etc. Ordenadas de esa forma, una primera barra representa la variedad de pasto que crece más o la cepa de ratas con mejor conversión alimenticia, la siguiente barra representa la segunda variedad con mejor producción y así sucesivamente. La dirección opuesta, el orden ascendente también puede ser utilizado. Esta recomendación es adecuada cuando hay una serie de cuadros con las mismas categorías. En este caso, es preferible hacer un orden de barras consistente, de principio a fin de la serie. También en una serie de cuadros de barras, el sombreado de las diferentes barras (negras, grises, blancas, con líneas etc.) puede ser adecuado.

Es frecuente utilizar el agrupamiento de grupos de barras de acuerdo a la categoría que representan, para comparaciones de gran certeza. El método de agrupamiento se determina por el objetivo del cuadro. De esta forma es sencillo para los lectores hacer comparaciones entre barras contiguas y entre barras lejanas.⁽⁷⁸⁾

15.2 Tablas

Las tablas de referencia contienen información que los lectores podrán utilizar como antecedentes, sirven como función de archivo y muchas veces, debido a la gran cantidad de datos, son colocadas fuera del texto con la finalidad de economizar espacio, mientras que preservan datos exactos. Esto es extremadamente importante ya que incluyen excelentes meta-datos, y la información descriptiva – qué, cuándo y en donde— que permita que los datos sean correctamente interpretados.

Las tablas demostrativas se proyectan para ser integradas rápidamente por el lector o espectador. Por ello es importante que sean claras y bien presentadas, usando razonables aproximaciones para reducir cantidades a unos cuantos dígitos significativos. Estas tablas pueden ser incluidas en el texto, de tal forma que los lectores no se preocupen por buscar la información hacia atrás o adelante del texto mientras leen.

Las tablas demostrativas muy cargadas de información son intimidantes y los lectores tienden a no leerlas. Si la información presentada es toda necesaria, puede ser dividida en componentes manejables. Las tablas sencillas surgen de mediciones, o de información cualitativa, son de recuento o frecuencias. Si los conteos son relativamente grandes, éstos serán comparados en tablas con varias filas y columnas,

las cuales son a menudo útiles para presentar porcentajes. Facilitan diferentes tipos de comparación y permiten hacer una cuidadosa elección.

La orientación de las tablas puede tener una considerable influencia en la redacción del trabajo. Es más fácil para el lector hacer comparaciones dentro de una columna de números que dentro de una fila/serie. Por lo tanto el propósito de una tabla es demostrar diferencias entre tratamientos o grupos de variables. El grupo debe definir la fila de la tabla y las variables deben definir las columnas.⁽⁷⁸⁾

El orden de las filas en una tabla es importante. En muchos casos, el orden es determinado, por ejemplo, por la naturaleza del tratamiento. Si ésta es una serie de tablas con las mismas filas o columnas, el orden puede ser usualmente el mismo para cada tabla. Si no es así puede elaborarse un orden de filas en las cuales los valores estén en orden descendente.

El número de dígitos y decimales mostrados en una presentación debe tener el mínimo de números que sean compatibles con el propósito de la tabla. Es aconsejable, en la medida de lo posible, utilizar de dos a tres dígitos significativos (p.ejem. 108.4 = 108).

Algunas veces las unidades de medición pueden ser cambiadas para hacer números más manejables. Por ejemplo números como 12,163 kg/ha pueden mejorarse al presentarse como 12.2 ton/ha. En otros casos los números pueden ser multiplicados o divididos por factores como son mil o un millón, puesto que mucha gente considera más fácil de leer y entender una estadística de 560 aves muertas anualmente de ascitis por 1000 animales de población, en lugar de 0.58870 animales muertos de ascitis anualmente.⁽⁷⁹⁾

16. ORGANIZACIÓN DE LOS RECURSOS

Como parte de la factibilidad del estudio, se debe tener en cuenta la organización del lugar donde se realizará la investigación, el personal que labora en un centro de investigación y la facilitación financiera para que pueda llevarse a cabo de manera completa. Así, es necesario identificar las partes que conforman el Centro, Instituto, o departamento donde se llevan a cabo experimentos.

16.1 Denominación de la Unidad de Investigación

Se refiere al equipo humano que, con el instrumental necesario, constituye una unidad funcional dentro de un área de investigación y que interactúa constantemente con otros grupos de trabajo. A esta unidad se le puede llamar:

- Departamento
- Unidad
- Grupo

La denominación es relativa, porque difiere entre el sector público y el privado. En una Universidad, por ejemplo, un departamento tendría más funciones académicas y administrativas, con muchas cátedras aglutinadas y con grupos de trabajo muy diversos, a

diferencia de un departamento en una empresa, que se define con criterios más funcionales de unidad, con un jefe responsable de las actividades científicas y administrativas.

16.2 Tamaño

El tamaño es muy variable, pero depende básicamente de las necesidades; por lo que se recomienda considerar lo siguiente:

- Tipo de organización adoptado.
- Existencia de unidades y subunidades de apoyo.
- Volumen de trabajo.
- Plazos para realizar las diferentes actividades.
- Colaboraciones con otros departamentos.
- Servicios de terceros.

Hay que tener presente que si se presentan problemas concretos con excesiva frecuencia, esto podría indicar un mal cálculo del personal necesario, inadecuada delimitación de funciones en el personal ya existente o inclusive hasta un salario inadecuado.

16.3 Autonomía

Es necesaria una jerarquización en cuanto a personal responsable y con la autonomía suficiente para tomar decisiones dentro de su ámbito en el que desarrolla sus habilidades.

16.4 Aglutinación

Se refiere a la organización de un gran equipo de investigación con relación a las unidades que lo integran. Se pueden establecer por especialización, o por líneas de investigación o proyectos, pero pueden ser mixtos.

16.4.1 Aglutinación de las unidades por especialización

Es la forma más común de agrupar las unidades o departamentos, es decir, el tipo de trabajo que desarrollan, es el que delimita los distintos equipos. Este sistema presenta ventajas, como las siguientes:

1. Alto grado de especialización: consigue mayor eficacia en cada disciplina.
2. Intervención en todas líneas: adquisición de una visión de conjunto.

16.4.2 Aglutinación de las unidades por líneas de investigación

El factor que delimita a los grupos de investigadores, son los objetivos de trabajo y no la especialización del personal. El grupo se conforma por distintos especialistas para trabajar conjuntamente en un mismo proyecto. Sus ventajas principales son:

1. Autonomía de proyectos: no hay interferencia con otros que se realizan.
2. Mayor flujo de información: implica el conocimiento de todo por todos; mayor objetividad en las opiniones.

16.5 Categorías de personal en función de sus responsabilidades

Es del todo necesario definir las categorías profesionales en función de la organización establecida. Lo que las hace diferentes, son las responsabilidades acordes con cada uno de los puestos de trabajo.⁽⁵⁷⁾ Por ejemplo:

- Director de centro o instituto.
- Secretarías: administrativa, académica, técnica.
- Unidades de apoyo: bioterio, cómputo, microscopía electrónica, microarreglos.
- Jefes de departamento (responsable de varios laboratorios).
- Investigador principal (Jefe de un laboratorio).
- Investigador asociado (si fuera el caso).
- Técnicos académicos.
- Técnicos de laboratorio.
- Laboratoristas.
- Auxiliares de intendencia.
- Estudiantes: a cargo del investigador principal.

16.6 GESTIÓN DE RECURSOS

Se define como la forma de administrar, controlar y dirigir las actividades de una organización que son necesarias para un funcionamiento eficaz, utilizando el personal y los materiales disponibles.⁽⁵⁷⁾

16.6.1 Recursos Humanos

Todas las personas que componen un grupo de investigación deben saber qué tienen que hacer y cuándo. Es importante disponer de una estructura humana bien definida, con un organigrama operativo y una definición clara y concisa de las funciones, competencias, obligaciones, dependencia y responsabilidad.

Es importante considerar que hay periodos de actividad variable en función de lo que se produce; por lo que es importante saber gestionar, para cada uno de estos periodos, la disponibilidad de una cantidad suficiente de personas; ya que puede haber personal subutilizado o no productivo y personal con una gran carga de trabajo. En relación al personal, se deben tomar en cuenta los aspectos siguientes:

- Disponibilidad (tipos de contratos)
- Cualificación (habilidades especiales)
- Entrenamiento: impartición de cursos.
- Motivación: incentivos económicos y por logros laborales.⁽⁵⁷⁾

16.6.2 Recursos Financieros

La asignación de recursos corresponde a la dirección y ésta debe asumir cierto grado de riesgo financiero, debido a que la obtención de resultados depende de una serie de factores, que naturalmente, pueden cambiar los beneficios de forma importante. Este es el motivo por el que muchos centros de investigación, tanto públicos como privados, necesitan recursos financieros externos o bien de programas de apoyo interno.

Acerca de la cantidad de dinero necesaria para el cumplimiento de los objetivos del centro de investigación, es difícil determinarla en los términos de este escrito. Sin embargo, es necesario tener en cuenta el origen del centro, a qué se dedica en la actualidad y las perspectivas que tiene en torno a la investigación y desarrollo que realiza. Aunque lo más común son los presupuestos anuales, que tienen las siguientes ventajas:

- Son más flexibles.
- Pueden regularse periódicamente.
- Se adaptan mejor a la realidad del momento.⁽⁵⁷⁾

16.6.3 Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)

Como herramienta para la buena gestión y organización de los recursos de la investigación, se implementan las Buenas Prácticas de Laboratorio, que son un sistema de calidad relacionado con los procesos de organización y las condiciones bajo las cuales, los estudios no clínicos de seguridad sanitaria y medioambiental (con animales) son:

- Planificados.
- Realizados.
- Controlados.
- Registrados.
- Archivados.
- Informados.

Objetivo. Asegurar la calidad y la integridad de todos los datos obtenidos durante un estudio determinado. El cumplimiento es necesario en todos aquellos estudios no clínicos de seguridad.

La calidad comparable de los datos experimentales constituye la base común del conocimiento entre los diferentes países. Si cada uno de éstos puede confiar en los datos obtenidos en otros países, se evita la duplicidad o repetición de los ensayos. De este modo, se ahorran gastos y tiempo y se produce una importante reducción cuantitativa de los animales destinados a experimentación.

Como mínimo, el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio requiere lo siguiente:

- Un **Director del Estudio**, designado por la institución. Éste actúa como la única fuente de control del estudio y asegura que el protocolo se apruebe y se

cumpla, que todos los datos experimentales sean registrados, que las BPL se apliquen y que todos los datos primarios, la documentación, los protocolos, especímenes y reportes finales sean archivados adecuadamente.

- Una **Unidad de Aseguramiento de la Calidad** independiente, que asegure que la dirección de las instalaciones, personal, prácticas y registros estén conforme a los reglamentos. Asimismo, que conserve el cronograma maestro de los estudios, supervise cada ensayo no clínico a intervalos para asegurar el cumplimiento y reporte conclusiones al director del estudio, que revise el reporte final para asegurar que refleja de manera precisa los datos primarios y que prepare y firme la declaración de aseguramiento de la calidad en el reporte final.

- **Procedimientos Operativos Estandarizados** (POE's) para el uso, mantenimiento y calibración del equipo, para las pruebas y métodos de laboratorio; para los aspectos relacionados con el uso de los animales, tales como, la identificación, cuidado, traslado y necropsia; histopatología, manejo y artículos de control, manejo y almacenamiento de datos. Cualquier desviación de estos POEs, debe ser autorizada y registrada por el Director del Estudio.

- **Un protocolo escrito para cada estudio** que describa los objetivos y métodos para la conducción del estudio.

- Todos los datos registrados en tinta, fechados y firmados con iniciales.

- Instalaciones de laboratorio y para animales separadas.

- El Reporte Final debe contener la declaración del cumplimiento firmado por el aspirante, el patrocinador y el Director del Estudio.⁽⁸⁰⁾

Se recomienda la lectura de los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de la OCDE y de la FDA Part 58—Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.^(81,82)

CUARTA PARTE

CUIDADO Y USO DE ANIMALES

17. El Ambiente Y El Manejo De Los Animales: Una Variable No Experimental

La respuesta de los animales sometidos a experimentación es influenciada por una gran variedad de factores, tanto genéticos como ambientales. El conocimiento de estos factores y la forma en que afectan la fisiología de los animales es necesario para controlar estos efectos y así poder minimizar la potencial influencia que las variables no experimentales puedan tener en los resultados de un experimento. Al minimizar las variables no experimentales se puede optimizar el uso de los animales en la investigación, docencia y constatación de productos biológicos.⁽⁸³⁾

Desde los años 1930's, se postula que composición genética, o genotipo de un animal, combinado con el desarrollo ambiental producen la expresión fenotípica del animal, lo cual está bien aceptado. El concepto utilizado para establecer a las relaciones de la genética con los factores ambientales es el de *dramatipo*, el cual fue propuesto por Russell y Burch en 1959. Ellos definieron al dramatipo como el patrón de desempeño (rendimiento) de una simple respuesta fisiológica de corta duración; la cual es relativa a un tiempo de la vida del animal. Está determinada por el fenotipo y el ambiente inmediato (microambiente), en el cual la respuesta es provocada. Este concepto hace diferencia entre el ambiental en el cual interactúan directamente los factores genéticos y el ambiente próximo o inmediato, que actúa sobre el sistema combinado. Simplificando, (genotipo + desarrollo ambiental = fenotipo) y (fenotipo + ambiente inmediato (microambiente) = dramatipo). Este concepto enfatiza la interrelación de la carga genética del animal, el ambiente en el cual es criado y alojado y el ambiente del laboratorio en el cual el animal es utilizado.

El genotipo puede ser controlado con el uso de animales genéticamente definidos, los cuales son producidos bajo sistemas bien estructurados de cruzamiento o bien por ingeniería genética. Esto es fácil de realizar a través de la adquisición de animales genéticamente definidos provenientes de criadores confiables y honrados. El cruzamiento en los laboratorios es difícil y consume mucho tiempo para mantener adecuadamente y asegurar la integridad genotípica de los animales. Si bien tales colonias pueden ser utilizadas, es necesario consultar a algún genetista para diseñar un programa de reproducción para producir animales con características genéticas bien definidas. Un programa de monitoreo genético podría ser también necesario para asegurar la pureza de las cepas que se utilizan en el laboratorio.^(83,84)

El fenotipo puede ser influenciado por condiciones ambientales que se presentan regularmente en las instalaciones en donde los animales son criados, para uniformizar el dramatipo, las condiciones ambientales en las cuales los animales son utilizados deben ser controladas al máximo.⁽⁸⁴⁾

Con el fin de discutir ordenadamente las condiciones del ambiente que pueden influir en la respuesta de los animales a la experimentación, éstas se separan en tres categorías de variables no experimentales: variables físicas, variables químicas y variables microbiológicas. Las variables físicas incluyen: el diseño y construcción de la caja o jaula, la temperatura, humedad, ventilación, intensidad de luz y fotoperíodo, ruido, cama, sistemas de bebederos, comederos, sistemas de alojamiento, transporte y manejo. Las variables químicas incluyen a contaminantes del alimento, del agua, cama y aire. Las variables biológicas pueden ser discutidas desde el punto de vista de las más comunes enfermedades virales, bacterianas y parasitarias de los animales y su influencia sobre la

fisiología de los animales y por ende de la respuesta de los mismos a la experimentación. El total de todos los factores incluidos en las tres categorías descritas combinadas con el bagaje genético de los animales constituyen lo que Russell y Burch llamaron fenotipo y dramatis. ⁽⁸³⁾

17.1 Factores Físicos

El ambiente y sus características específicas varían según la especie animal y el protocolo experimental. En general, los parámetros ambientales se evalúan a nivel del local de alojamiento (cuartos), lo que es conocido como macroambiente. Sin embargo es más importante el control del microambiente de la jaula, que es el alojamiento inmediato de los animales, puesto que las condiciones entre uno y otro pueden variar considerablemente. ⁽⁸⁵⁾

17.1.1 Diseño de la Caja

El diseño de la caja o jaula y el material de que está construida pueden influir sobre los resultados de la experimentación. Las cajas de material galvanizado y las gomas de los tapones de los bebederos pueden ser la vía por la que minerales traza pueden afectar los resultados de los estudios. Además se debe tomar en cuenta que los animales deben ser alojados en cajas sobre una cama y no directamente sobre el piso de metal de las jaulas. La forma para obtener ciertas muestras puede requerir el uso de jaulas metabólicas, o bien, cuando se efectúan estudios de comportamiento se prefiere el uso de jaulas traslúcidas a las opacas. Las características de comportamiento de la especie animal pueden orientar sobre la selección del tipo de caja o jaula adecuadas, por ejemplo: algunos animales requieren perchas, posibilidad de colocar nidos o lugares para esconderse, mientras que otros animales pueden requerir contenedores empotrados, como los mecanismos de contención en las jaulas de primates. También deben tomarse en cuenta las necesidades reproductivas, que pueden requerir cajas con características específicas. En algunas especies, como la chinchilla y hámster, por ejemplo, al macho se le debe permitir tener la forma de escapar de hembras, que son muy agresivas. Muchos neonatos son inestables en cuanto a su termorregulación, por lo cual deben ser protegidos de las paredes frías del alojamiento con materiales aislantes. ⁽⁸⁶⁾

17.1.2 Temperatura y Humedad

La temperatura y humedad en los cuartos de los animales (macroambiente), debe ser monitoreada y mantenida dentro de límites aceptables. La temperatura y humedad en el microambiente es más difícil de monitorear y de controlar. Las variaciones en la temperatura y humedad se presentan por influencia de algunos factores como el tipo de filtros de las cajas, la integridad de los tubos de bebederos automáticos, la densidad de la población en las cajas o jaulas, el nivel de actividad de los animales, la localización de la caja o jaula, y la temperatura y humedad del cuarto por sí misma. ⁽⁸⁷⁾ La temperatura óptima para el alojamiento de los animales se encuentra, generalmente, dentro de la zona de neutralidad (rango ambiental dentro del cual se mantiene la temperatura corporal con un mínimo de actividad metabólica), o ligeramente inferior a ésta. ^(87,88) Las variaciones en la

temperatura y humedad pueden ocasionar una gran variedad de efectos. Por ejemplo, de manera frecuente la exposición a altas temperaturas puede causar, en conejos, el lamido del pelo. Ésto, a su vez, puede ocasionar la formación de coprolitos debidos al pelo ingerido.^(83,87,88)

Trabajos experimentales efectuados principalmente en ratas han demostrado que el rango de temperatura óptimo para los cuartos de los animales es de 20 a 26 °C (68 a 70 °F). En estos trabajos se obtuvieron los siguientes datos:

- El peso de los recién nacidos no difiere dentro de los 12 a 32 °C, ni al momento del destete en el rango de 18 a 28 °C, sin embargo la ganancia de peso corporal después del destete, disminuyó en ambos sexos cuando la temperatura fue por debajo de los 18 °C y por encima de los 30 °C.
- Cuando la temperatura alcanza los 30 a 32 °C, así como cuando disminuye hasta los 12 °C, el tamaño y la tasa de destete de las camadas disminuyeron significativamente.
- Asimismo se ha demostrado que la exposición al frío -4 °C afecta al sistema microsomal enzimático, aumentando su actividad en ratas Long-Evans; pero disminuyéndolo en ratas de la cepa Holtzman.⁽⁸⁹⁾

Poca humedad, menos de 30% de humedad relativa se asocia, en roedores, con la lesión llamada “cola anillada” (ring tail), la cual se caracteriza por constricciones anulares de la cola que en situaciones graves pueden causar la pérdida del apéndice.^(84,88) Más sutiles efectos de la temperatura y humedad incluyen: alteraciones en el metabolismo de drogas, incremento en la susceptibilidad a enfermedades y disminución en la eficiencia reproductiva. Estos ejemplos sirven para ilustrar la necesidad de controlar la temperatura y humedad tanto en el macro como en el microambiente y el vital rol que juegan en la generación de datos consistentes y confiables.

17.1.3 Ventilación

El propósito de la ventilación es proveer a los animales de sus requerimientos de oxígeno y calor, así como de remover los metabolitos de la respiración. Además, mediante la ventilación se regula la humedad y se logra una dilución ambiental de bacterias y polvo que provienen de las jaulas. La incorrecta ventilación en los cuartos de los animales puede tener un impacto significativo en la salud de los animales. Cuando la ventilación no es la apropiada, inmediatamente se observa un incremento en la concentración de amoníaco y si bien éste afecta a todas las especies, son las ratas y ratones las más afectadas.⁽⁹⁰⁾ Cuando las concentraciones de amoníaco sobrepasan las 25 ppm se presenta “estasis ciliar” en bronquios lo que provoca acumulación de moco, el cual sirve como medio de sustento para el desarrollo de *Mycoplasma spp.* Sin embargo no se encuentran cambios significativos en el pH sanguíneo, pCO₂ y en la apariencia histológica del pulmón y tráquea y sólo se encuentran cambios menores en los niveles de enzimas microsomales hepáticas.^(90,91) Además, las concentraciones de amoníaco capaces de causar patologías son mucho menores que los niveles umbrales captados por el humano. Muchas características del

diseño del bioterio pueden afectar la ventilación de los cuartos, incluyendo la localización, número y configuración de los ductos de inyección y extracción de aire.⁽⁸⁸⁾

El nivel de ventilación de la caja o jaula, adicionalmente puede verse afectado por la presencia y/o el tipo de filtro de aire de la caja, de si su diseño es adecuado y se con ello permite el paso adecuado del aire hacia la caja. La ventilación adecuada permite reducir la concentración de gases de desecho al mínimo, reduce la diseminación de enfermedades, provee de una temperatura y humedad estables y evita las corrientes de aire.^(85,88)

17.1.4 Luz

Tres aspectos son los han de tomarse en cuenta, asociados con la luz ambiental, ya sea natural o artificial.

Espectro de luz
Intensidad de la luz
Fotoperiodicidad

Espectro de luz: La luz del sol tiene un espectro de aproximadamente 300 a 2000 nm y se considera necesario que la luz artificial tenga un espectro similar.

Aún cuando las lámparas incandescentes y fluorescentes tienen relativamente el mismo espectro que la luz solar, se debe considerar que las lámparas incandescentes aumentan el espectro del rojo y disminuyen el del violeta, fenómeno que se observa de forma inversa con las lámparas fluorescentes. Si bien es posible inducir la formación de “cataratas” en animales experimentales expuestos a niveles altos de luz ultravioleta no existen datos suficientemente confiables para suponer que este problema se presente en las condiciones normales del laboratorio.⁽⁹²⁾

La intensidad de la luz y el fotoperiodo en los cuartos de los animales puede afectar la función reproductiva y la visión de los animales. La recomendación de la Guía para la intensidad de la luz en los cuartos de los animales es de 75 a 125 candelas (fc=footcandelas).^(85,92) No obstante la exposición prolongada a tales niveles de intensidad de luz puede causar degeneración irreversible de la retina en roedores albinos y 25 candelas se han sugerido como la intensidad más adecuada para este tipo de animales. La retinopatía fototóxica se caracteriza histológicamente por una pérdida progresiva de las capas externas de la retina (10 capas normalmente) y de los fotorreceptores y sus núcleos. El tiempo necesario para la presentación de este cuadro varía desde 2 a 3 semanas hasta 6 meses dependiendo de la severidad de la exposición (11,18).^(93,94) El control en la variabilidad de la luz se puede efectuar con aparatos como un reloj-dimmer (conmutador de luces), colocado en la acometida eléctrica general del bioterio o bien por relojes individuales colocados en cada cuarto. La posición de las cajas en los anaqueles puede ser un factor importante ya que es probable que exista una diferencia apreciable en la intensidad de luz entre el entrepaño más alto y el más bajo.⁽⁹²⁾ El fotoperíodo o ciclos de luz / oscuridad pueden modificar al comportamiento reproductivo tanto como a los ritmos circadianos. Un ciclo de luz diario de 12 a 14 horas es usualmente recomendado para la mayoría de las especies.^(83,85)

La presencia de ventanas, puede afectar la reproducción en animales sensibles a cambios sutiles de luz. Las ventanas en los corredores pueden ser deseables para propósitos de observación, sin embargo pueden proveer de luz suficiente para afectar los ritmos circadianos en animales de hábitos crepusculares.

La duración y tipo de luz puede afectar la presentación de estros. En algunas ocasiones ésto es deseable, sobretodo porque permite la manipulación de los ciclos reproductivos. Estas técnicas han sido utilizadas en algunas especies de roedores, gatos y animales de granja. La inversión de los ciclos de luz puede utilizarse para adaptar los ritmos circadianos, el ciclo de sueño y efectuar estudios reproductivos fuera de las horas normales de trabajo de la institución. Los relojes-dimmer individuales dan una mayor flexibilidad para satisfacer una variedad de requerimientos experimentales.⁽⁹²⁾

17.1.5 Ruido

El ruido excesivo puede también alterar el comportamiento reproductivo de los animales. Las evidencias experimentales acumuladas indican que la exposición al ruido intenso puede conducir a una amplia variedad de cambios funcionales y estructurales en los animales de laboratorio. A pesar de no existir información específica al respecto, parece ser que la intensidad de ruido en la cual se presentan problemas en humanos es la misma que para los animales.^(86,95) Existen diferencias importantes en la sensibilidad auditiva entre las diferentes especies de animales de laboratorio, por ejemplo, las chinchillas son especialmente sensibles a frecuencias de sonido muy bajas. Tal vez la especie más susceptible al ruido sea el ratón, en el cual, dependiendo de la cepa, puede llegar a causar convulsiones y afectar las secreciones de ACTH, STH y adrenalina.⁽⁹⁵⁾ Niveles excesivos de ruido pueden causar daño mecánico en el sistema auditivo tanto en animales como en humanos. Algunos efectos incluyen pérdida de audición, eosinofilia, incremento en los niveles de colesterol e incremento del peso de las glándulas adrenales. Se recomienda que los niveles de ruido en las instalaciones de los animales no sobrepasen los 85 decibeles (db).^(85,86)

17.1.6 Accesorios de las Cajas

Otros aspectos del ambiente de la caja deben considerarse. La presencia o ausencia de cama depende de los animales y de la situación, por ejemplo muchos programas de producción utilizan algún tipo de cama para asegurar la sobrevivencia de las crías. Un material de cama ideal debe ser libre de polvos, no palatable, absorbente y libre de agentes contaminantes e infecciosos. La decisión para seleccionar un sistema de bebederos adecuado depende de la especie, diseño del experimento y algunos factores del manejo. Los sistemas automáticos de bebederos son caros de instalar y de mantener, sin embargo a largo plazo son más higiénicos y ahorran mucho tiempo y manejo. Cuando el diseño del experimento requiere suministrar algún compuesto en el agua de bebida, o bien medir la ingestión diaria de agua, entonces será necesario utilizar botellas. La selección del tipo de alimento y del sistema de alimentación es también dependiente de la especie y de la situación experimental; algunas especies como el hámster suelen alimentarse frecuentemente de alimento del piso de la caja debido a su amplio hocico lo cual le permite obtener alimento que otros roedores no pueden

coger. Otras especies como los conejos no toleran fácilmente cambios en la composición del alimento.^(83,85)

Cuando se diseña un experimento, es importante consultar a algún experto o bien, informarse adecuadamente sobre la biología y requerimientos de manejo y cría de las especies que serán utilizadas.

17.1.7 Tamaño de la Caja y Número de Animales Alojados

Deben tomarse algunas consideraciones sobre el tamaño de la caja. Existen requerimientos específicos sobre el tamaño de la caja, los cuales se pueden consultar en las normas y guías nacionales e internacionales. El tamaño de la caja depende de las especies utilizadas, peso de los animales, número de animales por caja y el sistema de producción. Además los requerimientos de espacio de piso, las características de comportamiento de la especie, la cepa y el sexo de los animales deben considerarse al alojar a los animales. Para algunas especies animales de características sociales el alojamiento individual puede causar estrés. Incluso entre animales sociables, la formación de nuevos grupos puede resultar en trauma fatal por peleas. Los ratones machos suelen pelear cuando son alojados en grupos, sin embargo las ratas machos normalmente no lo hacen. El comportamiento agresivo puede ser específico de ciertas cepas; por ejemplo las ratas machos de la cepa F344 y los ratones de la cepa C57BL se consideran generalmente mucho más agresivos que otras cepas de las utilizadas comúnmente en el laboratorio.⁽⁹⁶⁾ Incluso en animales dóciles la sobrepoblación o hacinamiento puede provocar peleas, canibalismo o estrés. La actividad reproductiva puede modificarse significativamente al hacer arreglos en los grupos alojados con ese fin; por ejemplo algunos grupos de hembras pueden entrar en anestro con la subsecuente sincronización del estro al introducir un macho en la caja de alojamiento (efecto Whitting).^(83,96)

17.1.8 Transporte

El efecto del transporte puede provocar un estrés significativo en los animales. Estudios bien documentados sobre transporte prolongado, alta temperatura ambiental, carencia de agua y potencial contaminación microbiológica demuestran que estas situaciones afectan significativamente los datos colectados durante el desarrollo de la experimentación. El transporte en vehículos con clima controlado y aire filtrado disminuye esta situación de estrés. Sin embargo, aún bajo condiciones óptimas de transporte se requieren de 1 a 5 días para que el sistema inmune y el peso corporal de los animales retornen a las condiciones normales. Es también importante de recordar que los cambios en alimentación, ingestión de agua y condiciones de alojamiento pueden afectar significativamente a los animales recién llegados al laboratorio.

17.1.9 Manejo

La frecuencia y tipo de manejo que los animales reciben es otra variable no experimental a tomar en cuenta. Los investigadores y los técnicos deben conocer y dominar las técnicas correctas de manejo y sujeción de las especies con que trabajan. Esto puede prevenir daños

a los animales durante el manejo. Algunas rutinas de manejo diario pueden ser necesarias y por lo tanto deben programarse adecuadamente para que no interfieran con las necesidades de la investigación. La estrecha comunicación entre el investigador y los responsables del manejo de los animales pueden minimizar el estrés del manejo. Por ejemplo, la recolección de muestras biológicas puede ser efectuada durante la rutina del cambio de cajas. Muchos animales son criaturas de hábitos, en los cuales, un manejo regular puede reducir el estrés.⁽⁸³⁾

17.2 Factores Químicos

Las sustancias químicas encontradas en el ambiente de los animales pueden ser intrínsecamente tóxicas, y su metabolismo puede resultar en la formación de productos tóxicos. Esto puede causar un daño directo a las células al interferir en la homeostasis celular. Los posibles efectos de estas sustancias dependen de su concentración, sus propiedades fisicoquímicas, así como la duración, frecuencia, ruta de exposición y sus potenciales interacciones.^(86,97) Estos químicos pueden influir varios sistemas del organismo. Por ejemplo, se ha demostrado que los químicos pueden afectar a las enzimas microsomales hepáticas, las cuales tienen muchas funciones que incluyen la biotransformación de drogas y químicos y la regulación de la eliminación de radicales oxígeno.^(88,97) El origen de estos químicos incluyen: El material de cama (viruta de maderas resinosas), desodorantes ambientales, insecticidas y altas concentraciones de amoníaco. Los agentes químicos pueden también afectar al sistema inmune. Algunos insecticidas pueden causar linfopenia. Los metales pesados pueden disminuir la resistencia a enfermedades por disminuir la formación de anticuerpos, alterar la capacidad fagocítica de las células polimorfonucleares y de los macrófagos, así como en la supresión en la producción de interferón.^(97,98)

Por lo tanto debe considerarse que:

- Un factor puede aumentar el efecto de un fármaco en una especie y disminuirlo en otra.
- No es posible predecir el efecto de un fármaco en un animal vivo basándose solamente en ensayos “*in vitro*”.
- Algunas sustancias se unen al citocromo en forma reversible (inhiben el metabolismo). Ejemplo: piperonil butóxido
- Pueden causar destrucción del citocromo p450. Ejemplo: tetracloruro de carbono.
- Aumentan la síntesis del citocromo p450 y citocromo C reductasa. Ejemplo: fenobarbital.
- Aumentan la actividad del citocromo p450 por mecanismos no conocidos. Ejemplos: cedreno, cedrol y DDT (se encuentran en virutas de madera resinosas).
- Aumentan el metabolismo esteroidal. Ejemplo:, ejemplo aminoglicósidos.^(86,97,98, 99)

17.2.1 Alimento y Agua

Existen muchos factores y contaminantes en la composición de las dietas utilizadas en animales de laboratorio, los cuales influyen de diversas formas en la respuesta obtenida en los experimentos.

Por ejemplo: Consumos altos de sucrosa y fructuosa en ratones, aumenta la duración del sueño inducido por barbitúricos, además la sucrosa aumenta la reacción letal a la penicilina G en ratas. Dietas deficientes en ácido linoléico disminuyen la actividad enzimática general en ratas. La deficiencia de proteína ocasiona una disminución del 50 al 75% en el contenido de citocromo p-450 en la mayoría de las especies.⁽¹⁰⁰⁾

El alimento y el agua pueden servir como vías de contaminación química para los animales de experimentación. El agua de bebida puede estar contaminada con solutos orgánicos sintéticos, como son los pesticidas. Los tralometanos pueden encontrarse en los bebederos y sus conexiones, como resultado del proceso de cloración.^(85,87) En algunos bioterios y laboratorios hiperclorinan o acidifican el agua como mecanismo para disminuir la contaminación microbiológica; sin embargo, estas técnicas pueden afectar la respuesta inmune. Los contaminantes inorgánicos incluyen: metales pesados y nitritos. Los alimentos pueden también ser origen de contaminantes como son los compuestos estrogénicos, aflatoxinas, insecticidas y conservadores alimenticios. Estos compuestos pueden encontrarse naturalmente en las plantas o ser remanentes de sustancias de uso agrícola, o bien resultado de contaminación durante el almacenaje o el proceso de elaboración.^(86,100)

17.2.2 Fármacos

La terapia con drogas, antes o durante el desarrollo del estudio, puede comprometer la confiabilidad de los datos obtenidos. Por ejemplo, la tetraciclina altera el funcionamiento de las células del sistema inmune a través de su habilidad para deprimir la quimiotaxis y la fagocitosis. Los aminoglicósidos pueden tener propiedades de bloqueadores neuromusculares, por lo cual pueden provocar efectos inotrópicos negativos en el músculo cardíaco y en la musculatura arterial. Otros agentes con actividad depresora neuromuscular incluyen a las tetraciclinas, la lincomicina y las polimixinas. Es importante que los investigadores y su equipo de trabajo estén enterados y concientes de los efectos que cualquier medicamento puede tener sobre los animales. De forma similar los antihelmínticos o insecticidas administrados a los animales por los encargados de la salud de los animales pueden afectar los resultados de la investigación, lo cual debe ser considerado durante el diseño del protocolo.^(97,98)

Cuando los agentes anestésicos son utilizados como parte del experimento, los investigadores deben elaborar las dosis adecuadas y balanceadas para provocar la anestesia, analgesia o contención química, tomando en cuenta el efecto que estos agentes pudieran tener sobre los resultados experimentales. Por ejemplo el agente disociativo hidrocloreuro de ketamina, es ampliamente utilizado en anestesia y contención, debido a su facilidad de administración y a que es efectivo en una gran cantidad de especies y tiene un amplio margen de seguridad. Sin embargo se debe tomar en cuenta el efecto cardiovascular de esta droga, la cual puede afectar el AMPc intracelular, la permeabilidad celular y los canales de calcio. El conocimiento farmacológico de estas y otras drogas utilizadas puede ayudar a

seleccionar las mejores y más adecuadas para cada protocolo de investigación y permitir una mejor interpretación de los resultados obtenidos.^(83,98)

17.3 Factores Microbiológicos

Los agentes patógenos microbianos pueden afectar la experimentación al causar enfermedades clínicas, lesiones y hasta la muerte. Sin embargo, en los animales de laboratorio las infecciones cursan frecuentemente de forma asintomática, quedando como portadores que desarrollan las enfermedades cuando entran en estrés por transporte o manipulación experimental. Los animales con infecciones latentes pueden no manifestar la enfermedad, sin embargo la experimentación puede comprometerse de principio a fin al provocar cambios sutiles en los parámetros bioquímicos, histológicos y fisiológicos.⁽¹⁰¹⁾

17.3.1 Enfermedades Bacterianas

Existe un buen número de agentes patógenos asociados comúnmente con los animales de laboratorio. Por ejemplo la micoplasmosis es una enfermedad endémica en muchas colonias convencionales de roedores; y puede causar infecciones en los tractos respiratorio y genital, y afectar la tolerancia al ejercicio, la sensibilidad a los anestésicos, incrementar la susceptibilidad a otros patógenos respiratorios, disminuir la eficiencia reproductiva y provocar una variedad de anormalidades del sistema inmune.^(86,101)

Los investigadores que utilizan conejos deben estar concientes de la incidencia y significancia de la pasterelosis como causante de enfermedad aguda o crónica. *Pasteurella multocida* es bastante común en colonias convencionales de conejos y puede causar infecciones en el tracto respiratorio, abscesos subcutáneos, infecciones del oído medio e interno, e infecciones del tracto reproductivo.

Algunas especies pueden servir como portadores asintomáticos de infecciones bacterianas que potencialmente causan graves enfermedades clínicas en otras especies; por lo tanto, en los cuartos experimentales no deben convivir especies diferentes. *Bordetella bronchiseptica* puede a menudo ser aislada de conejos “clínicamente sanos” en los cuales raramente causa enfermedad, sin embargo puede causar enfermedad respiratoria aguda en cobayos. Además existen agentes patógenos específicos de especie, así las infecciones posquirúrgicas pueden ser causadas por una innumerable cantidad de bacterias, normalmente presentes en el ambiente de los animales, por lo cual es importante que en procedimientos quirúrgicos invasivos se sigan los procedimientos asépticos necesarios para minimizar los potenciales efectos de estos agentes oportunistas.^(83,86,101)

En otro sentido, una buena cantidad de enfermedades bacterianas de los animales de laboratorio pueden ser transmitidas al hombre y por consiguiente deben tomarse las precauciones necesarias al utilizarse estos animales. Esto incluye a la tuberculosis, salmonelosis, campilobacteriosis y shigelosis.^(86,101)

Los investigadores que tengan contacto estrecho con los animales deben informarse y conocer plenamente las guías y políticas institucionales que con respecto a la prevención de enfermedades zoonóticas estén vigentes en sus instituciones. Estas políticas deben incluir un programa de exámenes físicos periódicos, un programa de educación para el personal, la inmunización cuando sea necesaria y apropiada y el uso de ropa de protección adecuada.⁽⁸³⁾

17.3.2 Enfermedades Virales

Las enfermedades virales en los animales de laboratorio pueden ocurrir de forma asintomática. Así como las enfermedades bacterianas y micoplásmicas, las enfermedades virales pueden presentarse cuando los animales están estresados. Estos virus, particularmente, pueden ser peligrosos debido a que sus efectos sobre los animales y los datos que de ellos se obtienen no se pueden reconocer a tiempo. Los efectos de estos virus en forma latente han sido bien definidos en ratas y ratones. El establecimiento de barreras físicas y químicas en las instalaciones en donde se producen animales libres de patógenos específicos, pueden ayudar a eliminar estos virus de la colonia. Tejidos contaminados, particularmente tumores murinos, se encuentran implicados en muchos brotes de enfermedad.^(86,101)

Existen enfermedades virales clave en animales de laboratorio más comunes, por lo cual es necesario que el investigador conjuntamente, con el médico veterinario responsable de la colonia, se familiaricen con estas enfermedades y aprendan como pueden afectar un proyecto de investigación particular.⁽⁸³⁾

El virus Sendai, por ejemplo, es un contaminante viral común en colonias convencionales de ratas y ratones, en las que puede causar cambios histopatológicos del en el tracto respiratorio, inmunosupresión y disminución de la eficiencia reproductiva, asimismo puede actuar de forma sinérgica con otros agentes patógenos respiratorios. Una enfermedad viral de ratones la cual puede cursar de forma asintomática y que es devastadora para las colonias es la hepatitis, causada por el virus de la hepatitis del ratón (MHV). Este virus pueden estar implicado en síndromes devastadores en ratones desnudos (nu/un), causa enfermedades respiratorias, hepáticas y entéricas graves. Incluso en animales asintomáticos el virus puede causar intensos efectos inmunológicos. Algunas enfermedades virales de los animales de laboratorio a menudo se asocian con enfermedades clínicas, afectando los resultados de la investigación, debido a la alta morbilidad y mortalidad que se presenta entre los animales, aún cuando los efectos del virus sean bastante sutiles. El moquillo canino, la panleucopenia felina y el sarampión de los macacos, son ejemplos de este tipo de infecciones virales. Aunque no generalmente como las enfermedades zoonóticas, algunos virus se pueden transmitir al humano. Ejemplos de esto incluyen a los virus de la coriomeningitis linfocitaria, el virus herpes de los simios y la rabia.

17.3.3 Enfermedades Parasitarias

Los parásitos de los animales de laboratorio también están implicados en la investigación como variables no experimentales. Algunos parásitos como *Trichosomoides crassicauda* de las ratas tiene la capacidad de provocar tumores; los cuales pueden ocultar significativamente los resultados de estudios de carcinogenicidad. Los ácaros de la piel del ratón pueden tener efectos en los parámetros inmunológicos. Los parásitos son también capaces de causar enfermedades clínicas significativas como son prolapsos rectales de los roedores relacionados con oxiuros y la perforación del intestino asociada con *Prosthenorchis elegans* en primates no-humanos. Algunos parásitos de animales de laboratorio pueden también transmitirse al humano. Por ejemplo *Hymenolepis nana* y *Entamoeba histolytica*.^(86,101)

Es importante recordar que aunque algunos animales de laboratorio no muestren signos clínicos de infección microbiológica, las infecciones pueden tener efectos profundos sobre los resultados de la investigación. Los investigadores que estudian la función inmunológica deben familiarizarse particularmente con los efectos potenciales de estos agentes sobre su investigación.^(83,101)

18 Lineamientos Generales en la Revisión de Protocolos de Experimentación en Donde se Utilizan Animales. (Canadian Council on Animal Care)

Los siguientes lineamientos para la revisión del protocolo son brindados para ayudar a los miembros del CICUAE y a los investigadores en la obtención de una completa y precisa descripción del uso de animales propuesto. Como documento definitivo, el protocolo aprobado debería sustentar las premisas sobre las cuales está basada la revisión objetiva del uso de animales en la ciencia:

- Que el uso de animales en la investigación, enseñanza y constatación es aceptable solo si promete contribuir al entendimiento de principios o aspectos del ambiente; principios biológicos fundamentales; o al desarrollo del conocimiento que de manera razonable se espere sea de beneficio para los humanos, animales o al medio ambiente;
- Que el alcanzar los estándares óptimos de cuidado y salud animal, resulte en credibilidad y reproducibilidad adecuada de los resultados experimentales;
- Que la aceptación del uso de animales en la investigación básica o aplicada depende sustancialmente de la afirmación general de la confianza en los mecanismos y procesos utilizados, lo cual asegura forzosamente, el uso humanitario y justificado de los animales; y
- Que los animales deberán ser usados solo si los esfuerzos de los investigadores han fallado para encontrar una alternativa. También son requisitos, un continuo intercambio de conocimiento, revisión de la literatura y adhesión a las Tres R's de Russell y Burch. Aquellos que utilizan animales deberán emplear los métodos más humanitarios sobre el menor número de animales, la especie adecuada y requerida para obtener información válida.

1. Principios Generales

Los siguientes son principios generales para la revisión del protocolo. Cada comité, tiene una responsabilidad ética, científica y social para aplicar un criterio de revisión y aprobación de un protocolo de manera justa, equitativa y consistente. Esto requiere la entrega de una completa y apropiada información por parte del investigador. Sin embargo, no todos los protocolos requieren el mismo nivel de revisión: la intensidad de la revisión deberá variar directamente con el nivel de intervención (grado de invasividad) de los procedimientos (de acuerdo a las categorías). Los protocolos que involucran estrés físico, psicológico o ambos (dolor, miedo) deben ser revisados completamente y requieren una fuerte justificación, que esté claramente sustentada por el conocimiento actual del problema a investigar.

Todos los aspectos del proceso de revisión del protocolo, incluyendo el estado de aprobación, correcciones, aclaraciones, modificaciones, y arreglos, deben ser documentados, sin importar la categoría de intervención.

Se debe aportar un resumen de los propósitos primarios y del uso propuesto de animales en un lenguaje comprensible para una persona leiga en la materia. Esto deberá incluir una descripción de los procedimientos diseñados para asegurar que el sufrimiento de los animales será evitado o al menos minimizado. El sometimiento a revisión de secciones con propuestas que contienen detalles excesivos de procedimientos no relacionados al uso de los animales es inadecuado, pero puede ser útil si se relaciona al mérito científico o al análisis estadístico. Los miembros del comité deberán pedir a los investigadores que aporten todas las descripciones con un mínimo de palabras técnicas: el comité está interesado primeramente en el uso responsable y humanitario de los animales.

Cada protocolo debe ser revisado periódicamente, si es el caso, y deben considerarse cambios en estándares y lineamientos, y nuevas propuestas en el reemplazo, reducción y refinamiento del uso experimental de los animales. La renovación y/o cambios de los proyectos de investigación, deberá permitir a los comités revisar las modificaciones propuestas al protocolo original, si las hay, y la justificación para los cambios. Las principales modificaciones, incluyendo cambios en las especies animales, categoría de intervención, la naturaleza del (los) procedimiento(s) invasivo (s) o cambios significativos en el uso de anestésicos/analgésicos deben ser sometidos al mismo nivel de revisión y cumplir con los requisitos, tal como si fuera una nueva solicitud. Todas las modificaciones deben estar aprobadas y documentadas por el comité antes de que el investigador inicie el experimento. El comité no deberá revisar un protocolo más de tres veces, después de lo cual, el protocolo debe ser rediseñado y sometido a un nuevo proceso.

Un miembro conocedor del proyecto de investigación (en este caso el secretario del comité), debe estar disponible para contactarlo las veces necesarias. Los requisitos para los permisos de estudios en vida silvestre, uso de compuestos radioactivos, riesgo biológico y otras circunstancias especiales se deben reportar en el protocolo. Generalmente, las copias de los permisos y licencias necesarias deberán acompañar al protocolo y ser presentadas ante el comité antes de que el proyecto comience.

2. Beneficio Potencial de la Investigación

Se requieren declaraciones claras sobre el propósito (objetivos científicos específicos) y el valor potencial del estudio (originalidad e importancia de la nueva información)

La información aportada dentro del formato-protocolo a revisión, deberá exponer ante el comité, con un sentido claro, la necesidad del proyecto experimental y la relación entre el experimento propuesto y el objetivo general.

Los proyectos aprobados y financiados por algunas agencias u organizaciones, o de fondos internos y que hayan sido revisados por una comisión *ad hoc* pueden someterse a una revisión breve y no profunda.

3. Alternativas de Reemplazo al Uso de Animales

Si los objetivos científicos del estudio pueden llevarse a cabo con el uso de modelos animales inferiores o no animales, el comité debe requerir del investigador que considere la alternativa. La ausencia de alternativas deben sostenerse con una breve descripción de los métodos y las fuentes utilizadas para determinar que las alternativas no están disponibles o no son viables, y/o una explicación de los aspectos del protocolo que excluye la utilización de modelos no animales o animales inferiores.

4. Selección del Modelo Animal

Deben ser descritas las características del modelo animal que hacen a la especie o cepa la apropiada para el estudio. Esto podría incluir características anatómicas, fisiológicas, de comportamiento, bioquímicas u otras consideraciones; las cuales propician que el modelo sea compatible con los objetivos de la investigación. Normalmente, los costos no son una consideración primaria.

5. Reducción del Uso y Número de Animales

La información aportada debe incluir una clara descripción del diseño experimental junto con la explicación estadística que sostenga el tamaño de la muestra, de los grupos experimentales y de control. Se puede recomendar un estudio piloto, particularmente cuando se requieran grandes cantidades de animales para un nuevo estudio, así como solicitar datos que permitan una mayor veracidad en la evaluación del grado de invasividad del procedimiento y del número de animales requerido. Generalmente, el número de animales a utilizar deberá optimizarse hasta el más alto grado posible, consistente con los estándares razonables científicos y estadísticos.

6. Refinamiento de la Técnica Experimental.

Una vez que ha sido determinado que el uso de animales es necesario y hay una justificación apropiada del número requerido, el comité y el investigador tienen una responsabilidad compartida para asegurar que las prácticas de crianza y procedimientos experimentales empleados, minimizan o eliminan el estrés físico y/o psicológico dentro de las limitaciones impuestas por los objetivos de la investigación.

Todos los miembros del comité y todos los investigadores tienen la responsabilidad de refinar los procedimientos continuamente. Algunos ejemplos de áreas potenciales de refinamiento incluyen: constante entrenamiento del personal, enriquecimiento ambiental para animales en cautiverio, adecuada planeación del manejo, antes, durante y después del procedimiento; adecuada anestesia y analgesia; selección del punto final más humanitario, adecuados métodos de eutanasia, cirugía de baja invasión, uso de adyuvantes menos tóxicos y apropiados métodos de transferencia y de transporte de los animales.

7. Establecimiento de Puntos Finales

La falta de un punto final humanitario bien definido, a menudo es un aspecto clave en la revisión del protocolo y una de las principales causas de objeción al mismo. Cuando se presupone la muerte de los animales, el comité debe considerar importante el curso del tiempo y severidad del proceso, supervisando el entrenamiento de los encargados de los animales así como el cuidado y tratamiento de los mismos y la prevención de complicaciones inesperadas. Si la frecuencia esperada, severidad y signos de morbilidad son desconocidas, debe intentarse un estudio piloto bajo la estrecha vigilancia médica veterinaria para responder a estas dudas. La muerte y el estado moribundo, como puntos finales, deben ser evitados. Se aplica eutanasia a los animales en la parte más temprana del punto final, de acuerdo con los objetivos científicos de la propuesta, y en concordancia con los criterios aceptables para la determinación de este punto.

Los procedimientos que involucran dolor severo constante y/o inevitable o privación de alimento y/o agua y el aislamiento durante períodos prolongados de animales conscientes, por ejemplo, experimentos en la categoría E, son considerados altamente cuestionables o inaceptables sin importar la trascendencia anticipada de los resultados.

8. Contención Física

La contención física, con la mano o en cepos u otros aparatos, a menudo se requiere para la exploración, toma de muestras y una variedad de otras manipulaciones clínicas y experimentales. La contención induce estrés y puede ser minimizado con el acondicionamiento del animal, el uso apropiado de dispositivos adecuados en tamaño y diseño para la especie y con la adecuada ejecución por personal experimentado.

La contención física que dure poco más que unos cuantos minutos sólo debe ser utilizada en animales conscientes, después de que los procedimientos alternativos han sido considerados y se encontraron inadecuados. Se debe evitar que los primates no humanos permanezcan sentados por períodos prolongados de tiempo.

9. Procedimientos Invasivos y Muy Estresantes

Se debe aportar una descripción del régimen pre-operatorio, que incluya: a) una descripción de los procedimientos y de la preparación del animal; b) descripción de cualquier sustancia, antibiótico o tranquilizante a ser administrado, así como su dosis y vía por la cual se aplicarán; c) descripción de procedimientos de ventilación pulmonar e instrumentación (aplicación de catéteres). Cuando se anticipa el uso repetitivo de una metodología particular, el comité deberá pedir al investigador que desarrolle detalladamente un Procedimiento Operativo Estandarizado, para someterlo al comité.

Se debe aportar información sobre el tipo de monitorización y el criterio utilizado para juzgar el nivel de anestesia/analgesia, por ejemplo: frecuencia respiratoria y cardiaca, reflejo corneal, sensibilidad profunda, color de membranas mucosas, relajación muscular,

así como una breve descripción técnica del procedimiento. Otra información que se debe incluir es la fuente, método, volumen y frecuencia del muestreo de sangre y/o tejidos. Debe existir una clara relación entre cada procedimiento y el objetivo de la investigación.

Se debe establecer el criterio para evaluar la presencia y severidad del estrés después de un procedimiento y aportar bases para la administración de analgésicos u otros procedimientos para minimizarlo o eliminarlo. Las cirugías múltiples u otros procedimientos repetitivos altamente estresantes en un animal, generalmente son inaceptables y no se justifican por ahorro económico. Protocolos que incluyen estos procedimientos deben sufrir una rigurosa revisión ética y de bienestar para su justificación.

10. Eutanasia

La selección del método apropiado de eutanasia (JAVMA Panel de Eutanasia 2000), debe ser específico para las especies y métodos experimentales utilizados, además de ser lo menos traumática para el operario, el cual debe contar con el entrenamiento y competencia adecuados. El criterio para la eutanasia, en términos de cambios de comportamiento y signos fisiológicos específicos de especies o en relación al diseño experimental, debe ser descrito claramente.

Se debe incluir una descripción de la disposición final de los animales que sobreviven durante el estudio o a su finalización.

11. Materiales Peligrosos

Antes de que inicie el proyecto, debe ser enviada al comité la aprobación correspondiente para el uso de agentes peligrosos (materiales radioactivos, ADN y ARN recombinante patógeno humano, vegetal o animal, toxinas peligrosas, químicos carcinogénicos, éteres). Debe aportarse, como parte del protocolo o en una copia anexa de la solicitud aprobada, una breve descripción del riesgo potencial a la salud de humanos o animales. De igual forma se debe incluir cualquier especial requerido hacia los animales, precauciones para el personal, requerimientos especiales de contención, almacenamiento específico, desecho y requisitos para eliminación de animales y procedimientos de emergencia.

12. Protocolos de Enseñanza.

El uso de animales para fines educativos es diferente en sus objetivos del uso de animales en investigación y/o constatación. El objetivo del uso de animales en la enseñanza es demostrar principios ya establecidos, para adiestrar alumnos en habilidades y técnicas manuales, y no para descubrir, probar o desarrollar nuevas técnicas o hipótesis.

El uso constante de animales en este campo debe estar basado en una sólida justificación ética y en objetivos educativos que no pueden ser alcanzados con alternativas (cultivo de tejidos, simuladores computacionales, modelos matemáticos, videos, etc.).

Todos los protocolos de enseñanza en donde se utilizan animales deberán someterse a una revisión por parte del comité, quien además podrá evaluar el grado de competencia, en cuanto al manejo de los animales y ejecución de los procedimientos, de los instructores o asistentes.

Se deberá describir, al final de la práctica, la disposición final de los animales vivos y de los cadáveres.

Los experimentos que causen dolor inevitable o en los que se efectúen procedimientos múltiples en un mismo animal, guiados sólo para la instrucción de los estudiantes o para la demostración de conocimientos ya establecidos, no están justificados.

13. Estudios de Campo en Vida Silvestre.

Los procedimientos experimentales que involucran la captura, manejo y liberación de animales silvestres deben ejecutarse con especial cuidado, debido a que la falta de procedimientos adecuados resulta en un alto grado de estrés para estos animales. Por eso, la captura, manejo y/o administración de drogas y toma de muestras y la eutanasia deben ser claramente descritas en todos sus procedimientos. En estas especies se debe evitar el confinamiento por períodos prolongados de tiempo.

REFERENCIAS

1. Argimon JM, Jiménez J. Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica. 3ra ed. Madrid: Elsevier. 2004.
2. Mendoza NVM, Romo PMR, Sánchez RMA, Hernández ZMS. Investigación, introducción a la metodología. México: FESZ UNAM, 2004.
3. McGuigan F, J. Psicología experimental. México: Trillas, 1996.
4. Christensen L. Experimental Methodology. 6th ed. USA: Allyn and Bacon, 1994.
5. Orlans FB. In the name of science. Issues in responsible animal experimentation. 1st. ed. New York: Oxford University Press, 1993.
6. Loew FM. Developments in the History of the Use of Animals in Medical Research. In: Dodds WJ, Orlans FB, editors. Scientific perspectives on animal welfare. 1st ed. New York: Academic Press. 1982: 3-6.
7. Monamy V. Animal Experimentation: a guide to the issues. 1st ed. Cambridge University Press: 2000.
8. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
9. Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud. Guía para escribir un protocolo de investigación. [online] [citado el 2 de agosto del 2008] [10 screens]. Available from: URL: <http://www.paho.org/common/Display.asp?Lang=S&RecID=4118>
10. Polansky NA. Social Work Research. Methods for the helping professions. The University of Chicago Press, Ltd., London 1975.
11. Sellitz C, Wrightsman LS, Cook SW. Research Methods in Social Relations. London: Holt, Rinehart and Winston, 1976.
12. Gauthier C, Griffin G. Using animals in research testing and teaching. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties [serial on line] 2005 [citado el 24 de octubre de 2006]; 24 (2), 735-745: [10 screens]. Available from: URL: <http://www.oie.int/eng/publicat/rt/2402/PDF/gauthier735-746.pdf>
13. Lemon R, Dunnett SB. Surveying the literature from animal experiments. BMJ Journal [serial online] 2005 [citado el 29 de mayo del 2008]; 330:977-978: [2 screens]. Available from: URL: <http://www.bmj.com/cgi/content/full/330/7498/977>
14. California Biomedical Research Association. Frequently Asked Questions. The Role Of Animals in Biomedical Research. [online] [citado el 30 de junio del 2008]. Available from: URL: <http://www.ca-biomed.org/pdf/mediakit/FS-FAQs.pdf>
15. Foundation for Biomedical Research. The proud achievements of animal research and the consequences of halting it. [online] [citado el 12 de mayo del 2006] [6 screens]. Available from: URL: <http://www.fbresearch.org/education/ProudAchieve.pdf>
16. SNM Advancing Molecular Imaging and Therapy. How to develop a research protocol. [online] [citado el 20 de mayo del 2008]. Available from: URL:

- <http://interactive.snm.org/docs/How%20to%20Develop%20a%20Research%20Protocol.pdf>
17. Festing MF, Baumans V, Combes R, Halder M, Hendriksen CFM, Howard BR, Lovell DP, Moore GJ, Overend P, Wilson MS. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: Problems and possible solutions. The Report and Recommendations of European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). [online] [citado el 20 de mayo del 2008] [25 screens]. Available from: URL: <http://ecvam.jrc.it/publication/WorkshopReport29.pdf>
 18. Festing M. Doing better animal experiments. The University of Adelaide. The Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching Ltd. [online] [5 screens] [citado el 10 de marzo del 2008]. Available from: URL: http://www.adelaide.edu.au/ANZCCART/publications/Better%20Animal%20Exp_11.pdf
 19. Johnson PD, Besselsen DG. Practical aspects of experimental design in animals. Institute of Laboratory Animal Research Journal. [serial online] 2002 [citado el 8 de marzo del 2006]; 43 (4): [5 screens]. Available from: URL: http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/43_4/v4304Johnson.pdf
 20. Knight A. Animal Experiments Scrutinised: Systematic Reviews Demonstrate Poor Human Clinical and Toxicologic Utility. Alternativen Zu Tierexperimenten Journal. [serial online] 2007 [citado el 29 de mayo del 2008]; 24(4): [6 screens] Available from: URL: <http://www.altex.ch/de/index.html?id=49&iid=95&aid=9&PHPSESSID=754da46c2991cbefd08c527af6bcc618>
 21. Cohen y Ángel. An Introduction to Logic and Scientific Method. New York: Hartcourt and Brace, 1934.
 22. Rowan NA. The benefits and ethics of animal research: FORUM Scientific American. 1997 febrero (276): 63-77.
 23. Swiss Academic of Animal Sciences. Ethical principles and guidelines for experiments on animals. 3rd ed. 2005. [online] [citado el 27 de febrero del 2008] Available from: URL: <http://ethics.iit.edu/codes/coe/swiss.acad.med.sci.2005.html>
 24. University of Colorado: Health Sciences Center (UCHSC) Animal Care & Use Program. [Homepage on the internet] 2007 [online] [citado el 3 junio 2008] Available from: URL: <http://www.uchsc.edu/animal/>
 25. American Veterinary Medical Association - The AVMA Guidelines on Euthanasia (formerly the 2007 Report of the AVMA Panel on Euthanasia). [online] 2007 [citado el 28 mayo 2008]. Available from: URL: http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf
 26. Research Animal Resources. Ethics and alternatives. (home page on the internet) University of Minnessota. Copyright 2008. Available from: URL: <http://www.ahc.umn.edu/rar/ethics.html>
 27. Herzog, H. Ethical aspects of relationship between humans and research animals. ILAR Journal 2008; 43 (1): 27-32.
 28. Regan T, Singer P. Animal Rights and Human Obligations. New Jersey USA: Prentice Hall, Inc, 1976.
 29. Elzanowski A. The Second World Congress on Alternatives and Animal Use in

- the Life Sciences. *J. Appl. Anim. Welfare Sci.* 1998; (1): 87-90.
30. Altweb, the alternatives to animal testing web site (Homepage on the internet) Baltimore. Copyright 2006. The Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing. Russell WMS, Burch RL. 1959. The principles of humane experimental technique. London: Methuen & Co. Ltd. [Reissued: 1992, Universities Federation for Animal Welfare, Herts, England.] [online] [citado el 21 junio 2006] Available from: http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm
 31. Goldberg AM, Frazier JM. Opciones alternativas al uso de animales de laboratorio. *Investigación y ciencia. Scientific American.* 1989; 157: 10-17.
 32. Rowan A. The Alternatives Concept. *Animal Welfare Information Center Newsletter.* April-June 1991; 2 (2):1-28. Humane Society of the United States Animal Welfare Information Center United States Department of Agriculture National Agricultural Library. [online] 1991 [citado el 28 febrero 2008]. Available from: URL: <http://www.nal.usda.gov/awic/alternatives/rowan.htm>
 33. Smyth D. Alternatives to animal experiments. London UK: Scholar Press, 1978.
 34. Rand SM. Selection of Animal Models. *Research Animal Methods.* University of Arizona. [Homepage on the internet] 2007 [citado el 31 julio 2008]. Available from: URL: http://www.uac.arizona.edu/VSC443/animalmodels/animalmodels_07.html
 35. Rollin BE, Kesel ML. *The Experimental Animal in Biomedical Research.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1990(1), 1995 (2).
 36. Festing MFW. The choice of animal model and reduction. *ATLA* 2004, 32 (supplement 2): 59-64.
 37. Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK. Requirements and selection of an animal model. *Israel Journal of Medical Sciences* 1987; 23:551-555.
 38. Beck JA, Lloid S, Hafezparast M *et al.* Genealogies of mouse inbred strains. *Nature genetics* 2000; 24: 23-25.
 39. Calabrese EJ. *Principles of Animal Extrapolation.* 1^a Ed. New York: Wiley, 1983.
 40. Glaxo Smith Kline. Research and Development. The role of transgenic animals in biomedical research. [Homepage on the internet] [citado el 31 julio 2008]. Available from: URL: http://www.gsk.com/research/about/about_animals_roles.html
 41. Dunn DA, Kooyman DL, Pinkert CA. Transgenic animal and their impact on the drug discovery industry. *Drug Discovery Today* 2005; 10 (11): 757-767.
 42. Kids for Research. Animals. [Homepage on the internet] [citado 31 julio 2008] Available from: URL: <http://www.kids4research.org/animals.html>
 43. CCAC (Canadian Council on Animal Care). CCAC guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animal for research, testing and teaching. Ottawa, Canada, [online] 1998 [citado el 28 mayo 2008]. Available from: URL: www.cac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/APP_OPEN.pdf
 44. National Research Council. Humane endpoints for animal used in biomedical research and testing. *ILAR Journal* 2000; 41 (2)

45. Morton DB. Punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. *Lab Anim* 2005; 8: 5-12
46. Stokes WS. Reducing Unrelieved Pain and Distress in Laboratory Animal Using Humane Endpoint. *ILAR* 2000; 41: 59-61
47. Centre National de la Recherche Scientifique. Le point limite en expérimentation animale. Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale. [online] 2002 [citado el 28 mayo 2008]. Available from: URL: <http://ethique.ipbs.fr/sdv/ptlimexpanim.pdf>
48. Sanford J, Ewbank R, *et al.* Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. *Vet. Rec.* 1986; 118: 334-338
49. Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. Animal Pain: evaluation and control. *Lab Anim* 1985; 19: 20-36
50. Stanford University. Research Compliance Office. Guidelines for Endpoint Monitoring and Humane Termination. The Administrative Panel on Laboratory Animal Care (A-PLAC). [online] 2002 [citado el 28 mayo 2008]. Available from: URL: <http://labanimals.stanford.edu/guidelines/endpoint.html>
51. Toth LA. Defining the Moribund Condition as an Experimental Endpoint for Animal research. *ILAR* 2000; 41 (2)
52. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección Ambiental. Salud Ambiental. Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos. Clasificación y Especificaciones de Manejo.
53. Fernández SP. Elementos Básicos en el Diseño de un Estudio. *Fisterra.com* [Homepage on the internet] 2008 [citado el 25 febrero 2008]. Available from: URL: <http://www.fisterra.com/mbe/investiga/1diseno/1diseno2.pdf>
54. Marcus DE. Design of animal experiments. [online] 2008 [citado el 24 octubre 2006] Available from: URL: <http://oslovet.veths.no/compendia/LAS/KAP28.pdf>
55. Festing MFW. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab Anim* 1994, 28: 212-212.
56. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Why do a pilot study? [Homepage on the internet] 2008 [citado el 12 marzo 2008] Available from: URL: <http://www.nc3rs.org.uk/downloadddoc.Asp?I d=400>
57. Zúñiga J, Tur J, Milocco S, Piñeiro R. *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana. 2001
58. Festing MFW. Design and statistical methods in studies using animal models of developments. *ILAR Journal* 2006; 47 (1): 6-14.
59. Isogenic Info. Avoiding bias. [Homepage on the internet] 2006 [citado el 3 de abril 2008] Available from: URL: <http://www.isogenic.info/html/design.html#bias>
60. Isogenic Info. Randomization [Homepage on the internet] 2006 [citado el 3 de abril 2008] Available from: URL: http://www.isogenic.info/html/7_randomisation.html
61. Isogenic Info. Methods of Randomization [Homepage on the internet] 2006 [citado el 3 de abril 2008] Available

- from:http://www.isogenic.info/html/7__randomisation.html#methods
62. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR Journal* 2002, 43 (4): 244-258.
 63. Isogenic Info. Blinding in practice [Homepage on the internet] 2006 [citado el 3 de abril 2008] Available from: http://www.isogenic.info/html/8__blinding.html#practice
 64. Corazón GR. Filosofía del conocimiento. Pamplona: Ediciones Universidad de Navarra. 1999.
 65. Artigas M. Filosofía de la ciencia. Pamplona: Ediciones Universidad de Navarra. 1999.
 66. De Aguilar-Nascimento JE. Fundamental steps in experimental design for animal studies. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2005, (20) 1.
 67. Petersen RG. Design and analysis of experiments. New York: Marcel Dekker Inc. 1985
 68. Fleiss JL. Design and Analysis of Clinical Experiments. New York: John Wiley & Sons. 1986
 69. Bakke OM, Carné X, García AF. Ensayos clínicos con medicamentos. Fundamentos básicos, metodología y práctica. Barcelona: Doyma. 1994
 70. Campbell DT, Stanley J. Experimental and quasiexperimental designs for research. Boston: Houghton-Mifflin. 1963.
 71. Mendez RI, et al. El protocolo de investigación. México: Trillas. 1986.
 72. Family, Heart, Study & Group. Randomized control trial evaluating cardiovascular screening and intervention in general practice: principal result of British family heart study. *Br Med J* 1994, 308:313-320.
 73. Morton DB. Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: Ethical, legal and practical aspects. In: Hendriksen CFM, Morton DB, eds. *Humane Endpoints in Animal Experimentation for Biomedical Research*. London: Royal Society of Medicine Press. p 5-12.
 74. De Boo J, Hendriksen C. Reduction strategies in animal research: a review of scientific approaches at the intra-experimental, supra-experimental and extra-experimental levels. *ATLA* 2006, 33 (4): 369-377.
 75. Wittes J. Sample size calculations for randomized controlled trials. *Epidemiologic Reviews* 2002, 24 (1): 39-53
 76. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Florida: Academic Press. 1977.
 77. Statistical Services Centre. [Homepage on the internet] Statistical Good Practice Guidelines. One animal per farm? Copyright 2008 [online] [citado el 29 mayo 2008] Available from: URL: <http://www.rdg.ac.uk/ssc/publications/guides/topoaf.html>
 78. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Homepage on the internet] Copyright 2008. Mlay GI, Urio NA. Considerations in the design of on-farm livestock experiments and evaluation of results. [online] [citado el 29 mayo 2008] Available from: URL: <http://www.fao.org/wairdocs/ILRI/x5490E/x5490e04.htm>
 79. Chapman M, Wykes C. Plain figures. 2nd ed. USA: HM Stationery Office. 1996

80. Case Western Reserve University. Research Compliance. [Homepage on the internet] Copyright 2008. Good Laboratory Practices for Animal Research. [online] [citado el 4 marzo 2008] Available from: URL: http://ora.ra.cwru.edu/research/ORC/iacuc/Case_IACUC_GoodLaboratoryPractices.cfm
81. EurLex. El acceso al derecho de la Unión Europea. [Homepage on the internet] 2008. Principios de buenas prácticas de laboratorio (BPL) de la OCDE [online] [citado el 1 febrero 2008] Available from: URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:050:0044:0059:ES:PDF>
82. Food and Drug Administration. USA. Office of Laboratory Affairs. [Homepage on the internet] 2001. Good Laboratory Practice [online] [citado el 1 febrero 2008] Available from: URL: http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/bimo/7348_808/48-808.pdf
83. Schofield JC; Brown MJ. Animal Care and Use: A Nonexperimental Variable. In: Essential for Animal Research: A primer for Research Personnel. 2ª Ed Washington University DCM Educational Services. 1994
84. Lang CM, Vessell ES. Environmental and genetic factors affect in laboratory animals; impact on biomedical research. Federal Proceedings 1976, 35: 1123-1165.
85. Woods JR. The animal enclosure a microenvironment. Lab Animal Sc. 1980, 30 (2) (2 pt 2): 407-413.
86. Lindsey JR, et al. Physical, chemical and microbial factors affecting biologic response, pp. 3-43, In: *Laboratory Housing*. Proceedings of a symposium organized by the ILAR Committee on Laboratory Animal Housing. Washington, DC; National Academy of Sciences
87. Allert JA, Adams RA, Baetjer AM. Role of environmental temperature and humidity in susceptibility to diseases. Ach Environ Health 1968, 16: 565-570.
88. Pakes SP et al. Factors that complicates animal research. In: Fox JG editor. Laboratory Animal Medicine. New York: Academic Press. 1994
89. Yamauchi C, Fujita S, Obara T, Ueda T. Effects of room temperatura on reproduction, body and organ weights, food and water intake and haematology in rats. Lab Animal Sc 1981, 31(3): 251-258.
90. Broderson JR, Lindsey JR, Crawford JE. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. American Journal of Pathology 1976, 85 (1): 115-127
91. Schaerdel AD, White WJ, Lang CM. Localized and systemic effects of environmental ammonia in rats. Lab Animal Sc 1983, 33 (1): 40-45.
92. Bellhorn WR. 1980. Lighting in the animal environment. Lab. Animal Sc. Vol. 30 (2) (2 pt 2): 440-450.
93. Greenman DLP. Influence of cage shelf level on retinal atrophy in mice. Lab Animal Sc 1982, 32 (4): 353-356.
94. Semple-Rowland SL, Dawson W. Retinal cyclic light damage threshold for albino rats. Lab Animal Sc 1987, 37 (3): 289-298.
95. Algers B, Ekesbo I; Stromberg, S. The impact of continuous noise on animal health. *Acta Vet. Scand* 1978 67: 1-26

96. Davis, D.E. 1978. Social behavior in laboratory environment. Pp 44-63 in Laboratory Animal Housing. Proceedings of a symposium organized by the ILAR Committee on Laboratory Animal Housing. Washington, DC; National Academy of Sciences.
97. Burek JD, Schwetz AB. Considerations in the selection and use of chemical within the animal facility. *Lab Animals* 1980, 30: 414-419.
98. Fouts JR. Overview of the field: environmental factors affecting chemical or drug effects in animals. *Fed. Proceedings* 1976 35: 1162-1165.
99. James RG. Environmental factors in drug metabolism. *Fed Proceedings* 1976, 35 (5).
100. Campbell TC, Hayes JR. Role of nutrition in the drug metabolizing enzyme system. *Pharmacol Rev* 1974 26 (3): 171-197.
101. Committee on infection diseases of mice and rats: Companion guide to infectious diseases of mice and rats. Institute of laboratory animal resources. National Research Council. Washington: National Academy Press. 1991

**SEMBLANZAS BIOGRÁFICAS
DE LOS AUTORES**

JAIME ALONSO NAVARRO HERNÁNDEZ

Nació en Celaya, Guanajuato, México, el 9 de junio de 1953 en el barrio de San Juan de Dios. Hijo de Hermenegildo Navarro Ramírez, Ingeniero Químico, por la UNAM y Adela Hernández Mendieta, Tecnóloga en Alimentos por el Tecnológico Regional de Celaya Guanajuato, miembro de una familia de 6 hermanos (3 hombres y 3 mujeres) y de una numerosa dinastía de más de 400 familiares, tanto de línea paterna como materna. Creció en un ambiente rural-pueblerino, netamente provinciano hasta los 14 años de edad; estudió la primaria en el Colegio México y la secundaria en la Escuela Oficial de Celaya. En 1967, emigró a la Ciudad de México donde vivió con sus padres y hermanos en la colonia Centro durante los tres años siguientes. Sin haber ingresado a la preparatoria de la UNAM a su llegada al D.F., aprovechó el año siguiente para aprender el uso del ábaco japonés en la Embajada de Japón en México y en 1969 ingresó a la Escuela Nacional Agrícola y Ganadera del Valle de México en Tlalpizahuac, Estado de México, donde estudió Técnico Agropecuario. En 1970 ingresó a la Escuela Nacional de Música de la UNAM, donde estudió canto profesional con el maestro Enrique Jasso Mendoza y guitarra acústica con el profesor Guillermo Flores Méndez. En 1971 ingresó a la Preparatoria Bertrand Russell y simultáneamente estudió Electrónica por correspondencia en National Schools. En 1973 terminó la preparatoria e hizo examen de admisión para ingresar, en 1974, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde hizo estudios de licenciatura y fue graduado con honores en 1979. Desde 1977 fue ayudante de profesor en el departamento de Fisiología y Farmacología. En 1986 estudió la especialización en Estadística Aplicada por el IIMAS, UNAM; entre 1994 y 1998 estudió los Diplomados en Evaluación de Proyectos e Ingeniería de la Calidad en la Facultad de Economía, y de Farmacología en la Facultad de Medicina por la UNAM. En el 2003 fue graduado con honores en la Maestría en Ciencias Médicas por la Facultad de Medicina, UNAM y fue profesor en posgrado de la Universidad Simón Bolívar. Desde 1977 y hasta 1988 laboró en la FMVZ como profesor de asignatura y ayudante de profesor en Físicoquímica, Fisiología General, Fisiología Veterinaria, Farmacología. En 1989 y hasta 1993 se desvinculó de la FMVZ para ejercer la profesión como asesor en Producción Avícola y Desarrollo Rural en el Centro Avícola de Teometitla, para el gobierno del Estado de Tlaxcala y como médico en comunidades rurales de Tlaxcala, Veracruz y Puebla. Simultáneamente, fue docente de tiempo completo en Estadística, Álgebra y Cálculo en el departamento de matemáticas, para 7 carreras profesionales de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP). En 1993 se reincorporó al Departamento de Genética y Bioestadística de la FMVZ como Profesor Asociado de Bioestadística. En 1994 obtuvo, por oposición, la plaza de Profesor de Tiempo Completo y posteriormente la definitividad y la promoción a Profesor Titular A de tiempo completo en Bioestadística, así como definitivo en asignatura por oposición en Fisiología. Desde su reingreso a la FMVZ, ha sido docente en Metodología de la Investigación, Bioestadística, Métodos estadísticos y Fisiología Veterinaria. En su trayectoria docente ha sido profesor de más de 6,000 alumnos y asesor de más de 40 tesis de licenciatura y posgrado, dentro y fuera de la UNAM; ha dictado decenas de cursos,

conferencias y seminarios sobre tópicos de estadística, muestreo, diseño experimental, fisiología, farmacología en la UNAM, en hospitales, institutos, escuelas y empresas del área de alimentos y metal mecánica; ha escrito capítulos de libros, memorias para congresos, artículos científicos, apuntes y manuales y ha sido miembro de comisiones dictaminadoras para concursos de oposición. El profesor Navarro sigue siendo académico de la FMVZ. Entre sus aficiones preferidas está el ciclismo, las caminatas a campo traviesa y su gran pasión es el beisbol, que lo aprendió de su padre desde que era niño.

ROBERTO AARÓN RAMÍREZ OJEDA

Nació un domingo 1 de julio de 1979, en Cd. Nezahualcoyotl, aunque su acta de nacimiento dice que fue en el DF. Hijo de Roberto Ramírez Márquez y María Esther Ojeda Mercado, quienes le inculcaron la empatía hacia los seres vivos, ambos originarios de la capital del país. De la infancia a la edad adulta vivió en la Colonia México Nuevo, cerca del área de Panteones en la Cd. De México. Curso la Preprimaria en la escuela Arq. Ramiro González del Sordo y la Primaria en la Escuela Oficial Lic. Manuel Gual Vidal, ambas en la Colonia Irrigación. La Secundaria en la Escuela Diurna No. 15 Albert Einstein localizada frente al Antiguo Colegio Militar en la Colonia Popotla. En 1994 ingresa al Bachillerato de la UNAM en el Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Azcapotzalco. En 1998 Ingresa a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. En 2005 realiza su servicio social en la Unidad Académica Bioterio del Insituto de Fisiología Celular de la UNAM, con la MVZ Claudia Rivera Cerecedo y el MVZ Héctor Malagón Rivero. Se gradúa en 2009 en la misma Facultad. Desde el año 2000 le pide al MVZ Eduardo Brizio Carter que le permita asistir a su Clínica de Pequeñas Especies en Xotepingo, Coyoacán, DF, donde laboró hasta el año 2012 y que le permitió formarse como MVZ dedicado a la cirugía y medicina de animales de compañía. Simultáneamente, de 2004 a 2008 se desempeñó como ayudante de profesor y formó parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (CICUAE) de la FMVZ junto a la MVZ Aline Schunemann de Aluja y el MVZ Carlos Villagrán Vélez. Elaboró artículos para el CICUAE, impartió clases de Fisiología Veterinaria y del Seminario de Bioética, participó en mesas redondas sobre bioética y es difusor de la responsabilidad que implica la relación humano-animal no humano; como consecuencia de todo su trabajo, ahora estudia la Licenciatura en Filosofía en el Sistema Abierto de la Facultad de Filosofía y Letras de la UNAM. Entre sus aficiones, disfruta mucho de la conversación, es meticuloso en la lectura, vive intensamente la música y es amante de la fotografía, sobre todo de vida silvestre. Actualmente labora en la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA).

CARLOS VILLAGRÁN VÉLEZ

Nació el 8 de enero de 1952 en la Colonia Obrera, en el centro del Distrito Federal, es el mayor de 6 hermanos hijos del Sr. Carlos Villagrán Arenas (RIP), originario de Huichapan edo. de Hidalgo y de la Sra. Margarita Vélez Gallegos, originaria de Churintzio edo. de Michoacán, inicio su instrucción primaria en la escuela Giner de los Ríos en la misma colonia Obrera y a partir de los 7 años su familia se mudo a Iztapalapa en donde termino la primaria en la escuela “Holanda” e ingreso la secundaria oficial N° 22 “Enrique O. Aragón”, durante ese tiempo convivió tanto con sus hermanos y amigos como con diversos animales pues alrededor de su casa había 2 establos, granjas de aves y borregos y caballos que llegaban a ser sacrificados en el rastro de Iztapalapa. En 1967, habiendo cumplido los 15 años, ingreso a la preparatoria N° 6 Antonio Caso de la UNAM, en donde vivió activamente la experiencia socio-política que desencadenó en el movimiento estudiantil de 1968. En 1970 ingreso a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en donde efectúo estudios de licenciatura, efectúo su servicio social en la escuela tecnológica agropecuaria 133 en Perote Ver. Al término del cual se graduó en el año de 1975 sin menciones honoríficas cosa que lo tiene sin cuidado. Desde ese año fue ayudante de profesor en el departamento de Fisiología y Farmacología y posteriormente profesor de asignatura de las materias de Fisicoquímica, Fisiología general y Fisiología Veterinaria, de estas dos últimas es profesor por examen de oposición abierto, desde el año de 1992 es profesor Titular A de Tiempo Completo de la materia de Fisiología Veterinaria habiendo ganado el examen de oposición abierto en el año 2002. De 1980 a 1984 estudió la Especialidad en Investigación Biomédica Básica en la torre de investigación (INCYTAS) del DIF bajo la tutoría del Dr. Joaquín Cravioto. Estudio la Maestría en Ciencias (reproducción) en la Universidad de Colima de donde espera graduarse próximamente. Como especialista en la Ciencia de los Animales de Laboratorio ha sido jefe del bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, jefe del bioterio del Laboratorio Nacional de Referencia Ssa, jefe del bioterio del Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez”, jefe del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, jefe del bioterio del convenio entre Química Hoescht-FMVZ UNAM. En su trayectoria docente ha sido Jefe del Departamento de Fisiología, Consejero Técnico Profesor, ha sido profesor de más de 7000 alumnos en las diferentes materias que imparte el departamento de Fisiología y Farmacología, además de impartir las materias de Bioética y Producción de animales de laboratorio. Ha asesorado más de 30 tesis, ha dictado decenas de cursos, conferencias y seminarios sobre tópicos de Fisiología, Bioética, Ciencia de los animales de laboratorio y metodología de la investigación tanto en la UNAM como en Hospitales, Institutos, Escuelas y Universidades en el D.F y en el interior del país; ha escrito capítulos de libros, memorias para congresos, artículos científicos, apuntes de las materias que imparte y ha impartido, así como manuales técnicos.

La primera edición en Samsara Editorial del *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales* de MVZ M. en C. Jaime Alonso Navarro Hernández, MVZ Roberto Aarón Ramírez Ojeda y MVZ Carlos Villagrán Vélez se publicó por primera vez en el mes de noviembre del 2018. La edición estuvo a cargo de la editorial y los autores.