

**Artículo de revisión**

**ANÁLISIS CRÍTICO DE LA CONTROVERSIA DEL USO DE ANIMALES  
EN LAS INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS BIOMÉDICAS**

Edgardo O. Alvarez<sup>1</sup> y Silvia G. Ratti<sup>2</sup>

(1) Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo e IMBECU-CONICET, Mendoza. Miembro titular CICUAL, FCM, UNCuyo, Miembro titular Comité de Bioética del Hospital Notti, Mendoza

(2) Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Ex-miembro titular CICUAL, FCM. UNCuyo.

Dirección de correo electrónico:

EOA: [ealvarez@fcm.uncu.edu.ar](mailto:ealvarez@fcm.uncu.edu.ar); SGR: [silratti@yahoo.com.ar](mailto:silratti@yahoo.com.ar)

## **RESUMEN**

En los últimos años, se ha generado una enconada discusión por parte de grupos proteccionistas y entidades científicas vigentes respecto al uso de animales en el laboratorio. Si bien es cierto, que bajo la perspectiva actual la historia ha mostrado abusos y acciones denigrantes hacia los animales en la sociedad humana, el progreso de los conocimientos y el desarrollo de la bioética, ha generado actitudes más humanitarias con respecto a este tema. Los reclamos de estos grupos defensores de los animales han generado ideas distorsionadas respecto al uso de ellos en la investigación científica, en gran parte por el carácter dogmático de sus argumentos y por una visión limitada y en extremo estereotipada

de la actividad científica de investigación. En la presente revisión, se consideran aspectos históricos de la relación hombre-animal; discusión del entorno y creencias de épocas remotas y su posterior evolución en el tiempo; análisis crítico de la publicación de Rusell y Burch como hito en la investigación científica humanizada a través de sus 3 R y la presentación de argumentos tan básicamente razonables que resulta hasta innecesaria cualquier justificación sobre la existencia de la actividad científica biológica en la humanidad.

Palabras clave: pro-animalista, 3 R, investigación con animales, investigación bio-médica

## **ABSTRACT**

In the past years a sustained issue has been generated between certain activists groups and scientific institutions regarding the use of animals in the biological research. A revision of the historical aspects about the interaction of humans and animals in the past clearly revealed abominable abuses to animals. However, in the present times the evolution of bioethics and the generation of scientific information have put into evidence a significant change in the human attitudes to animals in biological research. However, the activist's claims have generated distorted ideas regarding the use of animals in experimental research, mainly due to the dogmatic character of their arguments, and

the propagation of a stereotyped vision about research procedures and researcher's attitudes to animals use. In the present revision, history aspects about the relationship of human-animal in the evolving society; discussion about the context and beliefs of the society at that time; critical review about the 3 Rs of Rusell and Burch historical landmark in the humane experimental techniques, and presentation of scientific arguments justifying use of animals in biological research are considered.

**Keywords:** pro-animalist, 3 Rs, biological research with animals, biomedical research

## **1. Introducción**

En los últimos años la investigación bio-médica en la República Argentina se ha enfrentado a una corriente de pensamiento que, en cierto modo, representa una actualización de un debate histórico sostenido a través de los años en distintas partes del mundo. Esta controversia ha adquirido una fuerza progresivamente pujante ameritando una reflexión de todos

aquellos profesionales que, ejerciendo la investigación científica, utilizan animales como sujetos experimentales. El espíritu de esta revisión, estará centrado en un análisis crítico de los argumentos principales de las posiciones antagónicas referidas a la dualidad, mutuamente excluyente del uso o no de animales de laboratorio para el progreso del conocimiento en el campo de la

bio-medicina. Desarrollando los autores distintas actividades en la investigación científica con animales, se ha considerado deber académico involucrarse en estas

discusiones, puntualizando falacias y errores tras el objetivo de alcanzar un consenso apropiado y una visión más realista de los conflictos en disputa.

## 2. El hombre y los animales: la evidencia histórica

Es bien conocido que desde los albores de la humanidad, las sociedades primitivas incorporaron animales como parte integral de su núcleo sociedad-ambiente<sup>1,2</sup>. Es posible que las intenciones de estos grupos estuvieran estrechamente relacionada con el beneficio alimentario que estos animales proporcionaban. De acuerdo a recientes evidencias paleontológicas este utilitarismo se extiende retroactivamente hasta la edad de hierro<sup>3</sup>. El perro es considerado como uno de los primeros animales adoptados por el hombre primitivo como parte de su entorno próximo cotidiano en Europa Central y data no menos de 12000 años A.C.<sup>2</sup>. En etapas posteriores, otras especies también fueron incorporadas como ovinos, caprinos, cerdos, caballos, gallinas y felinos<sup>2</sup>. Estas evidencias claramente señalan que el hombre estableció nexos con los animales con un deliberado propósito práctico que por un lado, solucionaba problemas de alimentación y por otro, proporcionaba herramientas vivientes de protección. Ambas razones tuvieron un definido sentido utilitario. Esta asociación con el paso de los siglos fue experimentando cambios a medida que los escenarios culturales fueron evolucionando

hacia condiciones menos agrestes para el hombre. A pesar que el advenimiento de la tecnología reemplazó el uso de muchos animales en algunas tareas originales, en la actualidad se conserva su usanza como alimentación debido a la condición heterótrofa natural del hombre. Sin embargo, el paso del tiempo puso en evidencia una necesidad adicional para el uso de los animales, no advertida por las sociedades humanas primitivas: la capitalización del conocimiento basado en la inspección de especies no humanas para entender la naturaleza de la enfermedad en el hombre, como es el caso de la Medicina. Así, los médicos de la antigua Grecia disecaban animales para entender la Anatomía y la Fisiología de los humanos, dado que existía una fuerte prohibición y condena para el uso de cadáveres<sup>4</sup>. Este nuevo aspecto generó un propósito altruista para el uso de los animales, sentando así las bases racionales de su utilización actual en la experimentación científica. También generó una enconada controversia que todavía persiste en algunos aspectos, a pesar que la base del repudio original ha desaparecido.

## 3. El lugar de los animales en la antigüedad (siglos III-XVIII)

En la antigüedad el estudio de los principios anatómicos y fisiológicos realizados en los animales, estuvo sustentado por las creencias de la época referidas a la supuesta insalvable diferencia entre el hombre y las otras especies. La fuerte influencia de la religión, destacando la supremacía del hombre por encima de los animales, creados para servirlo y la noción que ellos no tenían alma<sup>5</sup> justificó innumerables actos de crueldad, tristemente inmortalizados en una serie de engramas popularizados por William

Hogarth en su *"The Four Stages of Cruelty"*<sup>5</sup>. Con esta perspectiva de telón de fondo, se popularizó la práctica de la vivisección definida como la cirugía exploratoria en animales vivos. No es sorprendente que destacadas figuras de la historia como Aristóteles, Diocles y Praxagoras (siglo IV, AC) se contaran entre los grupos que usaron esta técnica<sup>4,6,7</sup> sin que esta práctica pesara lo más mínimo en sus conciencias. Más aún, la extensión lógica y exagerada de estos argumentos llevó a los miembros de la

Escuela Dogmática como Erasistratus y Herophilus (siglos III-IV, AC) a la práctica de la disección y vivisección en criminales convictos, considerando que, además de los argumentos vigentes, de esa manera los criminales “amortiguaban” su ofensa a la sociedad. Es interesante considerar que los conocimientos obtenidos por estas prácticas influenciaron de una manera importante a Galeno, el destacado médico romano que además perfeccionó estas técnicas en los animales<sup>6,5</sup>. Sin embargo, la práctica de la vivisección cayó en descrédito por una pujante corriente de pensamiento denominada la *Escuela Empírica* (siglo III, AC) que rechazó la experiencia y práctica de la vivisección por considerarla inmoral debido a la crueldad inherente al proceso y que el dolor provocado por el tormento

modificaban el aspecto natural de los órganos; por lo tanto no aportaba información útil para la Medicina<sup>5</sup>. A pesar que existieron reclamos por el abuso y la crueldad infringida a los animales en períodos subsiguientes, en ninguna ocasión estos factores tuvieron un peso substancial. Por ejemplo, para Tomás de Aquino (Siglo XIII), eminente teólogo cristiano, el maltrato dado por alguien a un animal perteneciente a otra persona era reprochable porque se estaba mancillando el objeto del propietario. Igualmente, el maltrato de algún animal en general, era condenable por la posibilidad de incitar en el agresor acciones crueles contra otra persona<sup>5</sup>. Como se puede ver, en ningún caso el aspecto animal por si mismo fue considerado.

#### 4. El resurgimiento de la vivisección

Después de la firme oposición por parte de la escuela Empírica a la experimentación animal con las técnicas de vivisección, la teoría hipocrática de los cuatro humores y la teoría pitagórica de los cuatro elementos predominaron en la enseñanza de la Medicina<sup>4,7,8,5</sup>. Pareciendo que estos dogmas habían recludo definitivamente la práctica de la vivisección al olvido, la historia mostró que este procedimiento resultó ser muchísimo más resistente que lo que se hubiera imaginado en un principio. Fue gracias a Vesalius, reconocido anatomista, médico y cirujano del período del Renacimiento, que al revalorar la información proporcionada por la experimentación animal, rescató una vez más la vivisección que llegó a ejercerla frente a sus estudiantes de medicina en los cursos correspondientes de la enseñanza de esta disciplina<sup>8,5</sup>. Además, en completa oposición y desafiando los dogmas católicos de la época, Vesalius disecó cadáveres y publicó descripciones anatómicas humanas muy precisas<sup>5</sup>. El empuje de la vivisección desafió aún más el paso del tiempo ya que con diversos argumentos, generados por figuras eminentes de la época, como Descartes en los años subsiguientes<sup>9</sup>, estas técnicas

continuaron ejerciéndose durante el siglo XVII y comienzos del XVIII. Una revisión detallada y meticulosa de todos estos sucesos históricos del conocimiento biológico ha sido publicada recientemente por Nuno Henrique Franco<sup>5</sup>; por lo tanto estos aspectos no serán mencionados en esta revisión.

En este punto de la historia de la Medicina y la experimentación animal, con una antigüedad de más de 200 años surge el argumento principal para una corriente del pensamiento que se opone drásticamente al uso de animales en cualquier disciplina científica biológica. Por razones prácticas en esta revisión, quienes sustentan esta posición serán identificados como *Pro-animalistas*. Los grupos *pro-animalistas* han crecido en los últimos años de una manera significativa. Algunos, han incursionado en tácticas académicas para hacer valer sus puntos de vista, participando en debates bajo el auspicio de pensadores contemporáneos como el filósofo australiano Peter Singer<sup>10</sup> y el filósofo norteamericano Tom Regan<sup>11</sup>; en cambio otros, han recurrido a métodos claramente enmarcados en el vandalismo y la delincuencia común, debilitando seriamente

los argumentos rescatables de la iniciativa original<sup>12,13</sup>.

Independientemente de cualquiera que sean las aproximaciones planteadas por los *pro-*

*animalistas*, el argumento de peso de sus críticas descansa en los conceptos de *vivisección*, *sufrimiento* y *animales sintientes*<sup>10,14</sup>.

#### 4.1 El argumento de la vivisección en la investigación de hoy

En la actualidad, no existe ningún laboratorio, centro de investigación, industria de productos farmacológicos, universidad privada o estatal, que utilice legalmente la vivisección en sus investigaciones específicas. La razón fundamental de esto no descansa en argumentos colaterales o preciosistas de una alteración del funcionamiento del organismo por estrés frente al procedimiento de prueba o al tratamiento en investigación; sino en una actitud lógica y consecuente, producto de la evolución mental del investigador científico actual, plasmada en el *respeto bioético* hacia el animal. Bajo esta perspectiva, el investigador (ser viviente) se enfrenta al animal de laboratorio (otro ser viviente) en términos de apreciación, reconocimiento y respeto. Esta conducta es el resultado evidente de una evolución del pensamiento humano que se desprende de su posición en la escala biológica y su relación con el resto de las especies. Sin embargo, esta actitud no debe confundirse con el *principio de la especiación* referido por Peter Singer en su libro "*Animal Liberation*"<sup>10</sup>, donde se considera como variable el "valor" moral entre el hombre y el animal. La biología evolutiva ha aportado

fuertes argumentos para destacar que en la aventura del cambio y la adaptación a través de los siglos por los sistemas vivientes, el hombre se ha impuesto por encima del resto de las especies restantes. Las ventajas que el hombre ha logrado de esta forma son muy evidentes en el mundo de hoy. Por esta razón el principio de responsabilidad como especie pensante hacia sus congéneres biológicos es una imposición evolutiva innegable e ineludible. Se puede decir coloquialmente que el humano para el resto de las especies no-humanas representa el rol de un "hermano mayor".

En la sociedad moderna, es indiscutible el aporte de la investigación científica que se destaca como una actividad social importante en el desarrollo y bienestar del hombre y también de los animales. La investigación biológica, como parte integral de la misma, utiliza el *reactivo* más particular y valioso en sus inquisiciones académicas: el animal de laboratorio. Esta es la relación del investigador para su *reactivo natural*. Dado que la vivisección ya no se practica y ni siquiera es admisible, cualquier alusión a ella en la actualidad no tiene peso ni poder como argumento en la disputa sostenida por los *pro-animalistas*.

#### 4.2 El argumento del "sufrimiento" de los organismos sintientes

El uso del vocablo "sintiente" (algunos autores utilizan la palabra "sensible") y su estrecha vinculación con el "sufrimiento" han sido propuestas muy inteligentes en los argumentos de defensa de los animales por varios autores<sup>10,11,14</sup>.

Sin embargo, la aceptación implícita de un antropomorfismo en el uso de los conceptos conspira y contradice la intencionalidad original. El significado del término "sintiente" se refiere a la propiedad de un organismo

para *sentir* o *darse cuenta* de cambios en el medio ambiente. No obstante, a pesar de la generalidad de su definición, el término se ha usado para la capacidad de *percibir* dolor<sup>11,10</sup>. Las investigaciones actuales han caracterizado de una manera razonable las bases neurofisiológicas del dolor y de todas las sensaciones que le permiten al hombre y presumiblemente también a los animales, el entendimiento del entorno ambiental que los rodea. Estrictamente hablando, el

término “sentir” se refiere a la respuesta de un receptor activado por un estímulo; la interpretación interna de esta sensación es la percepción. Se considera que un organismo “se da cuenta” si posee transductores biológicos sensibles a diferentes tipos de energía ambientales y circuitos neurales que procesen esta información<sup>15,16,17,18</sup>. Por esta razón el reconocimiento de colores, contacto, olores, visión y sabores son percepciones que son el resultado de una activación central de circuitos neurales que reconocen la codificación aferente de sus receptores periféricos. Esta propiedad transforma el manejo de estas sensaciones en un acontecimiento *interno y personal*. En el caso del hombre, aparte de la vivencia interna, el dolor es fácilmente entendible (como también las emociones), no solo por la respuesta comportamental desplegada, sino por la información expresada oralmente en palabras o escrita de la percepción. En el caso de los animales, el científico *presume* la existencia del dolor en base a respuestas conductuales que son parecidas a las del hombre y que pueden estar acompañadas por variaciones hormonales o indicadores del estrés en la sangre. No obstante, desde el punto de vista científico estricto, nadie puede *asegurar* que un animal *percibe* exactamente lo mismo que un humano frente a un estímulo nociceptivo. En este sentido, es interesante mencionar el artículo VII de *Los Principios Guía Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales* del Consejo Internacional de las Ciencias de Animales de Laboratorio (ICLAS), que dice: “*Los investigadores deberían suponer que los procedimientos que causan dolor o distrés en los seres humanos, causan dolor o distrés en los animales, a menos que exista evidencia de lo contrario*”<sup>19</sup>.

Se deberá notar que en esta exposición, el argumento de transposición de un proceso natural en el hombre hacia el animal, es esencialmente el mismo que en ciencias se utiliza para estudiar al animal para su proyección en el hombre.

Este sentido bidireccional del uso del conocimiento ha estado presente en varias ocasiones en numerosas investigaciones de

mecanismos biológicos, como lo reflejan los clásicos estudios de memoria y aprendizaje en humanos con algunas patologías que afectaban regiones específicas en el cerebro<sup>20,21</sup> y los de lateralidad funcional donde los hallazgos en ratas respaldaron lo encontrado en humanos, por citar solamente algunos<sup>22,23,24</sup>.

En la tesis *pro-animista*, la manipulación de los animales sintientes, termina necesariamente en *sufrimiento*. Para Rusell y Burch, los propulsores del paradigma de “las 3 R” esta característica está enmarcada a los organismos vertebrados<sup>14</sup>. Se desprende de este argumento que el resto de la comunidad viviente no califica para la clasificación “sintiente”. Sin embargo, desde la perspectiva fisiológica, considerando las bases estructurales y la anatomía comparada, cualquier organismo que posea un sistema nervioso o su expresión evolutiva equivalente (ganglios); reuniendo la tríada “receptor - vía aferente - neurona central”, tiene las bases biológicas necesarias para “sentir” y “percibir”, aún cuando su “percepción” para los humanos sea totalmente desconocida<sup>25,26,27</sup>. Más aún, en este grupo de animales “antiguos” o “primitivos”, la posesión de un sistema nervioso con las características mencionadas anteriormente y de una complejidad neuronal notoria<sup>25</sup> han servido de modelo para entender las propiedades de los mecano-receptores en humanos, como es el caso del grillo, el saltamontes y la cucaracha<sup>28,29,30</sup>. Bajo esta perspectiva, es paradójico considerar que aplastar con un pie a un animal como un perro o un gato, no provoca las mismas reacciones humanas de protesta si el mismo acto se realiza en una cucaracha o un grillo. Desde el punto de vista científico, el apelativo de *sintiente* está desconectado de las bases racionales fisiológicas para asignar tal característica a distintos ejemplares en la cadena evolutiva. Por lo tanto, el uso de este argumento es relativo, inconsistente y arbitrario.

Finalmente, el término “sufrimiento” cuya definición es esencialmente antropomórfica, de “paciencia, conformidad o tolerancia para soportar una cosa” (diccionario de la Real Academia Española), difícilmente se condice

con el sentido que se le da en las críticas *pro-animalísticas*. En un hipotético caso de un animal sometido a un ataque, la etología y la neurociencia conocen que la respuesta conductual de éste está muy lejos de la inmovilidad y tolerancia estoica de la agresión. La huida o defensa, son las respuestas más habituales. Ciertamente, este animal no “sufre” sino trata de evitar el estímulo nociceptivo. En otras ocasiones, por ejemplo el perro, en un estado endócrino conocido como “seudo-preñez”, el animal presenta las respuestas comportamentales estereotipadas típicas de una hembra preñada que incluye el aislamiento en un rincón a manera de refugio, a pesar de que no está preñado. Esta conducta no es evidencia de un “sufrimiento” del animal, sino que obedece a un estado neuroendocrino bien caracterizado. Más aún, desde otro punto de vista como el enfoque bioético, el término “sufrimiento” implica una elaboración interna del pensamiento del sufriente que la distingue del dolor como queda claramente expresado en la frase: “...*El sufrimiento no es, en sí, una*

*vivencia orgánica, aunque puede ser acompañante indeseado del dolor. El sufrimiento no es primario, como el dolor, sino que se presenta con reflexiones, búsquedas de sentido, intentos de explicación...*”<sup>31</sup>. Es muy obvio que tal descripción solo es aplicable a los seres humanos. Tal vez, muchas de las incongruencias que se plantean en las discusiones de estos temas se podrían mejorar si se invierte un poco de tiempo en definir o redefinir específicamente términos claramente ajustados para los animales en cautiverio. En vez de insistir estoicamente en el uso de “sufrimiento” para expresar la idea de un animal sometido crónicamente a una condición de incomodidad o molestia, se podría emplear el concepto de “padecer”, que en la primera de sus acepciones considera “sentir físicamente y corporalmente un daño” (Diccionario de la Real Academia Española) sin necesariamente hacer alusión al hombre. Por lo tanto, es aplicable a cualquier sistema viviente, independientemente de la naturaleza, tipo o especie del organismo en cuestión.

## 5. El animal de laboratorio

En la sociedad humana actual, al igual que en las primitivas, los animales ocupan una posición de relevancia en las actividades propias de la comunidad. Si se define esta relación en términos del utilitarismo cultural, los animales se pueden clasificar globalmente en:

- 1) Animales de alimentación.
- 2) Animales de divertimento.
- 3) Animales de compañía.
- 4) Animales de laboratorio.

Esta categorización es aplicable solamente a los animales en cautiverio que por esta condición, no tienen las facilidades o no disponen de las variadas alternativas de acción presentes en el ambiente natural de donde provienen.

El animal de laboratorio, al igual que aquellos de la categoría (1) tiene un propósito específico claramente definido y consistente. Mientras que los primeros, como ya se mencionó con anterioridad,

cumplen un rol natural en la cadena alimenticia, los segundos cumplen con la necesidad de comprender la biología y mejorar la salud humana<sup>19</sup>. De esta manera, los animales de laboratorio no son juguetes ni mascotas y su permanencia en recintos cerrados en condiciones de luz y temperatura controladas, obedece a una pauta rigurosa de regulación de los factores principales que pudieran originar variaciones en los experimentos planeados del laboratorio. Su cuidado no es un capricho ni una excentricidad de un grupo de sujetos ociosos que dispone de los medios económicos para mantenerlos. Son simplemente el reactivo biológico para la experimentación científica de los sistemas vivientes. El significativo beneficio que ha surgido de la investigación animal, no solo ha alcanzado al hombre, sino también a los propios animales. Así, qué médico veterinario podría ignorar como sus

diagnósticos y tratamientos farmacológicos en la actualidad han beneficiado a sus pacientes.

Estas ideas están internacionalmente enunciadas en el artículo I de *Los Principios Guía Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales* del CIOMS-ICLAS<sup>19</sup>.

## 6. El paradigma de las 3 “R” de Rusell y Burch: bondades y limitaciones

W. M. S. Rusell y R. L. Burch, publicaron en 1959 el manual titulado: *“The Principles of Humane Experimental Technique”*<sup>14</sup> que pasó en gran parte inadvertido por alrededor de 25 años en el campo de la ciencia<sup>32</sup>. Escrito con un estilo literario libre y algo no convencional, los autores difundieron principios básicos de la actual disciplina “Metodología de la Investigación”, desarrollada formalmente a partir de las matemáticas y la estadística de alrededor de la mitad del siglo XX<sup>33,34,35</sup>. Fue una época donde la comunidad científica empezaba progresivamente a considerar la necesidad

del tratamiento estadístico de los trabajos experimentales<sup>14</sup>. Las bondades, contribuciones, análisis y pautas del manual de Rusell y Burch son muchas, varias de ellas aún con valor vigente en la actualidad que indudablemente, son material didáctico muy valioso para los jóvenes profesionales que se inician en la investigación científica. Como siempre ocurre con las propuestas bien organizadas, el entusiasmo desmedido y la sinonimia de los principios llevados a la categoría de dogmas por algunos de sus seguidores, desacreditan las intenciones de los autores originales.

### 6.1 Reemplazo

El “reemplazo” (la primera de las 3 “R”) está definido como *“cualquier método científico que utilice material no sintiente que en la historia de la experimentación reemplace a los métodos que utilizan vertebrados vivos conscientes”*<sup>14</sup>. Esta directiva en su esencia dice que es preferible no utilizar sistemas biológicos sensibles en la realización de un experimento si es posible reemplazarlos por otros que no posean esta propiedad. Esta afirmación en términos generales y para un principiante en ciencias tiene un valor didáctico razonable. Lamentablemente, su aplicabilidad resulta más limitada que la pretendida por los autores al formularla. El reemplazo de un procedimiento de una determinada característica por otro, conlleva la mayor parte de las veces a un cambio del diseño experimental. Esto, desafortunadamente incide en las hipótesis que se están investigando, cambiando los alcances y la potencia del estudio, ya que los modelos estadísticos son muy sensibles al diseño<sup>33,34,35,36</sup>. Así, por ejemplo si un fisiólogo está estudiando la participación de un determinado neurotransmisor en la

generación de una conducta motora en un animal, puede elegir entre otras, una técnica de estimulación trans-sináptica en un animal consciente con una cánula implantada en un núcleo cerebral, a través de la cual, administrará distintas dosis del neurotransmisor en estudio. Este procedimiento *in vivo* requerirá varios animales, tal vez 10-15 sujetos, según una disminución razonable de la varianza de la variable con que se mide la actividad motora. Un procedimiento alternativo para la misma situación podría ser trabajar con una preparación *in vitro* de neuronas en cultivo, en donde posiblemente se requeriría un solo animal que proporcionaría una gran cantidad de neuronas. Incluso, tendría la ventaja que la experiencia se podría repetir 3 veces con distintos animales para asegurar una mayor representatividad del proceso en estudio. Esto, desde el punto de vista de la recomendación de las 3 R de Rusell, podría ser una brillante idea, ya que en el nuevo experimento el número de animales sintientes se reduciría drásticamente a 1-3.



El problema es que de efectivizar el reemplazo, el investigador no estaría evaluando la (o las) hipótesis que el *diseño* in vivo le permitiría. Para comenzar, la variable original (actividad motora) no estaría presente ya que todo el conjunto de tejidos *in vivo* que proporciona la respuesta conductual (tractos nerviosos, médula espinal, neuronas motoras, cerebelo y fibras musculares, por mencionar algunos) no existen *in vitro*. Entre otras, la disposición tridimensional de las neuronas en el centro nervioso y sus conexiones colaterales con otras neuronas y centros de asociación típicos del cerebro, importantes para la modulación de la respuesta conductual, tampoco están representadas en el cultivo. Por supuesto, no se incluiría en esta crítica el aporte de la circulación sanguínea, inexistente en la preparación *in vitro*. Por esta razón, en el cambio proporcionado por el “reemplazo” independientemente de la modificación de la hipótesis de trabajo original, también se reemplaza la variable, cuyo máximo alcance se restringiría a una “mayor o menor actividad eléctrica”, o bien a una “mayor o menor concentración” en el medio de algún neurotransmisor, o sub-producto neural. La especulación que ese fenómeno se corresponde con una respuesta conductual motora, por supuesto, es bastante discutible. El sacrificio de los 3 animales en la propuesta de reemplazo no contribuiría a la solución del problema planteado con el diseño *in vivo*. Esto, desde el punto de vista bioético no es aceptable y perjudica las conclusiones del estudio. No existe peor experimento para un investigador que aquel donde la información es incompleta o inútil; si se han empleado animales, estos fueron sacrificados en vano. Por último, la ponencia de reemplazar los animales por sistemas *in vitro*, mecánicos, electrónicos o informáticos en la práctica de la investigación biológica, ha sido esgrimida insistentemente por algunas corrientes *pro-animalistas*. A pesar del avance significativo de la tecnología, que ha generado ingeniosas propuestas híbridas de cultivos de tejido en un *micro-chip* que sus creadores declaman como modelo ideal para estudios de fisicoquímica de microambientes,

interacciones tejido-tejido y fisiología de órganos<sup>37</sup>, el novedoso sistema sigue siendo una variante de los cultivos *in vitro*. No excluye el uso de animales que son necesarios para proporcionar las células ni está exento de las críticas ya mencionadas en esta Sección.

Por otro lado, la descripción reciente de la generación de un software que describe un ciclo reproductivo del *Mycoplasma genitalium*<sup>38</sup> y que el autor destaca su utilidad como modelo de investigación microbiológica sin necesidad del microorganismo, representan expectativas muy entusiastas y reduccionistas de la naturaleza biológica propiamente tal. La complejidad de una célula de mamífero, o de una neurona del cerebro es tan alta que cualquier neurocientífico difícilmente crea que puede representarse por un software, por muy ingenioso o avanzado que sea<sup>39</sup>. El programa está restringido a las instrucciones básicas que el operador ha insertado en los algoritmos que lo hacen funcionar, por lo tanto no podría ofrecer una solución “novedosa” que ya no esté prevista en la programación. Si el “organismo sintético” frente a un estímulo no ensayado antes genera un tipo de respuesta *in software*, novedosa, necesariamente debe haber sido por haberla seleccionado del conjunto interno de parámetros ya almacenados previamente. Además, estos resultados no significarían necesariamente que una célula viva equivalente vaya a elaborar el mismo tipo de respuesta. Es más, podría ser que la respuesta de la célula sintética ni siquiera exista en la real. Este tipo de “conducta” de lo artificial es rígida y está enmarcada por los algoritmos internos.

En cambio, una célula es plástica y sus reacciones frente a los estímulos del medio nunca dejan de sorprender al biólogo. Esto es muy comprensible porque se tiene que considerar que un “software” está diseñado por un bioingeniero o varios, con un *stock* limitado de instrucciones y una neurona o una célula cualquiera, está “diseñada” para responder con un incontable repertorio de respuestas por un proceso generador de experiencia de miles de años de evolución natural. Por esta importante razón, por el

momento no hay un reemplazo apropiado del animal por otra cosa en la investigación

bio-médica y es posible que la situación no cambie en mucho tiempo.

## 6.2 Reducción

“Reducción”, la segunda afirmación de las 3 R de Rusell y Burch<sup>14</sup> no tiene una definición explícita, como es el caso de “Reemplazo”. Presumiblemente, el entendimiento directo de la palabra y las aclaraciones pertinentes en la discusión original del término en el manual, sesgaron una explicación complementaria. Esta “R” se refiere a la necesidad de disminuir el número de animales utilizados en un experimento. En el tiempo de Rusell y Burch, este tópico era de una fervorosa preocupación ya que en el campo de la biología, la técnica del “bio-ensayo” para los estudios farmacológicos y endocrinológicos estaba en su apogeo. Este procedimiento que por diseño usaba una gran cantidad de animales, se consideraba el marco de referencia para la evaluación de la actividad de sustancias en sangre cuya concentración era muy baja (como el caso de las hormonas). El advenimiento del uso de radio-isótopos que sustentó el desarrollo del radioinmunoensayo y las técnicas de unión de receptores (*binding*), permitió reducir de una manera importante la gran cantidad de sujetos usados por el bio-ensayo. Por lo tanto, la esmerada dedicación y los argumentos estadísticos esgrimidos por Rusell y Burch para aconsejar reducir el número de sujetos de este histórico procedimiento<sup>14</sup>, ya no son necesarios en la investigación fármaco-tóxico-endocrinológica de la actualidad. De hecho, el uso de radioisótopos en los últimos años en las disciplinas biológicas se ha reducido de una manera sensible debido a consideraciones de equilibrio ecológico mundial. La utilidad de estas técnicas radioactivas ha sido reemplazada por procedimientos inmunológicos, combinados con técnicas histoquímicas o a la generación de dispositivos de alta sensibilidad como HPLC, electroforesis capilar y otros, que proporcionan información de una manera tan eficiente como los procedimientos de mitad del siglo XX.

Independientemente de esto, la presentación de evidencias fuera de contexto y claramente sesgadas en pos de una impresión efectista, se han popularizado en la difusión de las ideas *pro-animalistas*. Por ejemplo, frecuentemente se hace alusión a la cantidad de especímenes usados mundialmente en un año por la comunidad científica, dejando entrever veladamente que este sacrificio bajo los auspicios de la ciencia no justifica el uso ni la muerte de los animales, generando la impresión de un “*animalicidio*”<sup>40</sup>. Sin embargo, lo que no se aclara y difunde es la cantidad de beneficios obtenidos por la información recolectada en términos de nuevos tratamientos médicos, nuevos fármacos para dolencias específicas, nuevas técnicas bioquímicas o quirúrgicas y nuevos diseños informáticos o tecnológicos en salud pública. Tampoco se da a conocer la cantidad de personas a nivel mundial beneficiadas por el avance de esta información. Si estas cifras se conocieran o se estimaran de la misma manera como se hizo con el cálculo de uso de animales, se podría establecer un índice relativo “costo-beneficio” y evaluar más críticamente el uso de animales en la investigación biológica. Es necesario aclarar que la mención de tal índice solo se refiere a un aspecto de evaluación académica en la problemática del uso de los animales y no tiene nada que ver con la justificación por algunos que el “*mal de pocos es un bien de muchos*”. Tal vez, el argumento de mayor solidez que pretende avocar por la reducción de número de sujetos en la experimentación biológica proviene de las propuestas estadísticas para la obtención del número necesario de sujetos para la ejecución de un experimento<sup>14</sup>. Como frecuentemente ocurre cuando se descubren modelos matemáticos, el entusiasmo ciega el conocimiento profundo de las propuestas por omisión, intencional o no, de las consideraciones que los matemáticos-

estadísticos declaran en sus modelos. Es importante hacer notar que estas técnicas específicamente se refieren a la estimación del número *mínimo* para encontrar una diferencia estadística en un diseño experimental determinado. De estas consideraciones, en Metodología de la Investigación es buena práctica **no** excederse demasiado en el número de sujetos si se alcanza la meta de una significación determinada. Tampoco es aconsejable que el experimento se realice con una cantidad *inferior* a dicho número.

El otro aspecto importante de mencionar, son las consignas matemáticas que son necesarias para que el procedimiento sea confiable en los procedimientos estadísticos para estimar el número de sujetos apropiados<sup>38,36</sup>. El punto es que algunos investigadores no toman en cuenta que en éstas se establecen varias condiciones que necesitan ser ciertas para que toda la propuesta tenga sentido real. Así, por ejemplo por mencionar solo algunas, la variable que el investigador utiliza para caracterizar su problema biológico, debe ajustarse a un modelo matemático

determinado (la distribución Normal); la propuesta matemática que define a esta variable (función de densidad probabilística) debe aplicarse tanto a la población de referencia como a la población problema y el valor de " $\beta$ " (probabilidad de cometer un Error de Tipo II, relacionado con erróneamente declarar que no hay diferencias significativas cuando éstas realmente existen) se debe prefijar en forma arbitraria<sup>33,36,41</sup>. Son muchas las veces que estas premisas no se cumplen, por lo tanto el cálculo de este número no significa mucho desde el punto de vista científico. Por estas razones, referirse en forma estricta a estos procedimientos estadísticos para evaluar un número y así reducir la cantidad de animales a utilizar, sin una evaluación previa de las variables y el diseño, científicamente no es aconsejable.

Considerando estos argumentos, tal vez la "R" de reducción de Rusell y Burch, debería reemplazarse por una "O" de "Optimización" que conceptualmente consideraría la idea principal de utilizar un número *razonable* de animales desde un punto de vista más realístico y científico.

## 7. Refinamiento

La última de las tres "R" de Rusell y Burch, es "refinamiento"<sup>14</sup>. Está definido como el conjunto de acciones por parte del investigador que desarrolla un estudio "*neutral*" de "*reducir a un mínimo absoluto la intensidad del distrés impuesta a aquellos animales todavía en uso*" en el experimento<sup>14</sup>. Rusell y Burch define "distrés" como la combinación de miedo y dolor en el animal y una investigación "*neutral*" es aquella donde la motivación y el objetivo del experimento no es la *caracterización* y *entendimiento* de los mecanismos del estrés por parte del o de los investigadores<sup>14</sup>. Este principio es el más rescatable de la tríada de las "R" y refleja la posición actual de la investigación en animales. En el caso de nuestros programas

de post-grado de entrenamiento científico para las Maestrías y Doctorados en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, en los capítulos dedicados a la investigación básica, este principio se enseña como un importante hito en la investigación en animales. Es interesante comentar que en su libro Rusell y Burch aclaran que existen 2 tipos de investigación: la "*estresante*" y la "*neutral*", sin descartar o desdeñar la investigación "*estresante*" en sí<sup>14</sup>. Esta indulgencia, sin embargo no ha estado presente en algunos CICUALES que evalúan proyectos de investigación y ciertamente, en las corrientes *pro-animistas* donde el rechazo a este tipo de estudios es aún más drástico.

## 8. El argumento de los “derechos animales”

En los últimos años, en repetidas ocasiones, se ha esgrimido en la polémica del uso de los animales en investigación bio-médica, el “derecho de los animales”<sup>42,43,44</sup>. La consideración de si los animales poseen algún tipo de derecho, en el sentido legal de lo que significa para una sociedad civil que vive constitucionalmente en el país, se tiene una respuesta clara y determinante, de acuerdo al Código Civil de la República Argentina. Los derechos se reconocen (por lo tanto, existen) en *personas* de carácter jurídico, según Título I, artículo 30, De las Personas Jurídicas y Título II, artículos 51 y 52, De la Existencia de Personas Visibles<sup>45</sup>. Es muy obvio que los animales no satisfacen la definición de “persona” en el sentido legal como lo reconoce el código ni tampoco es aplicable el término “derecho” que está referido exclusivamente a los integrantes humanos de una sociedad. Por lo tanto, los animales no tienen derechos.

Sin embargo, esto no significa que las personas relacionadas de alguna manera con los animales en la sociedad, estén exentas de responsabilidades hacia ellos, como ya se mencionó en párrafos anteriores. No obstante, el 27 de septiembre del 1977, en Londres, se efectivizó la Declaración Universal de los Derechos del Animal (DUDA) con un total de 14 artículos referidos a los supuestos “derechos” de los animales<sup>42</sup>. Independientemente de las buenas intenciones de fondo de la declaración, sus artículos son afirmaciones idealizadas, que responden al paradigma de una igualdad absoluta de la condición de “animalidad” compartida con el hombre; tesis que desde la perspectiva biológica es discutible. Los “derechos” para un animal son enunciados en términos hegemónicos, sin ningún fundamento racional, científico o legal. Si este procedimiento se hiciera general, de la misma manera se podrían declarar los derechos de los árboles, de los libros, de los edificios, etc, ya que el único cimiento racional es simplemente la declaración explícita de los buenos deseos con respecto al tópico, asunto o entidad en cuestión. Mucho más inoportuno al respecto, es la

difusión por algunos simpatizantes de las ideas proclamadas por DUDA con carácter de ley universal<sup>43</sup>, que bajo un análisis crítico científico pone en evidencia la inconsistencia y debilidad de los argumentos. Por ejemplo, se dice que todos los animales tienen “derecho a vivir sin hambre y sin sed”<sup>43</sup>. Si se imagina un ambiente natural, sin la participación explícita del hombre, un ratón salvaje (que de acuerdo al enunciado, tiene el “derecho” de alimentarse), sale al terreno abierto para lograr su propósito. Un ave de rapiña que sobrevuela la región (que también tiene el “derecho” de alimentarse) cae sobre él, atacándolo y matándolo. De acuerdo con lo anterior, en esta situación se ha violado el derecho del ratón; pero al mismo tiempo, por otra parte, se ha respetado el derecho del ave de rapiña. El incumplimiento y a la vez cumplimiento de los “derechos” de ambos animales llevan a una situación lógica antagónica y absurda.

La segunda afirmación dice que los animales tienen “derecho a vivir cómodamente”<sup>43</sup>. En un ambiente natural, como el bosque u otros, con lluvias, barro, tormentas de polvo y variaciones importantes de temperatura, es difícil imaginar que los animales que naturalmente pueblan este entorno puedan aspirar al “derecho” de vivir “cómodamente”. Lo cual, por supuesto en el ámbito de la discusión académica se llega a la pregunta de qué es lo que se considera “cómodo” para el animal.

No es necesario comentar las incongruencias biológicas de los otros tres “derechos” mencionados en el artículo<sup>43</sup> que fácilmente pueden anticiparse. Tampoco, es necesario insistir en la mesa de discusión científica, un análisis completo del concepto clave de lo que se entiende por “derecho”, cuyos alcances y significado están claramente definidos en el código civil y el ejercicio de la ley. Como muchas veces ocurre, el empobrecimiento y la escasa meditación en la definición de conceptos clave entorpecen y debilitan causas nobles como la preocupación por el bienestar animal. Sería necesario un mayor esfuerzo intelectual para generar principios más científicos y acordes

en temas tan candentes como la utilidad de los animales en la experimentación biológica. También, son lamentables los mensajes con carácter de máximas que, dejando de lado la contradicción de la lectura misma, están impregnados de un fuerte sentimiento anti-científico, como lo ejemplifica la frase: *“debemos esforzarnos por contrarrestar con humanidad los imperativos científicos”*<sup>43</sup>.

Es posible, sustentando la preocupación legítima de la sociedad actual por los animales, pensar en estrategias legales distintas a la insistencia fútil de la posesión

de derechos. Existen marcos establecidos donde se regula y se determinan enunciados reglamentarios específicos para los animales. Por ejemplo, imitando la reglamentación proteccionista para determinadas especies, como peces, aves y ciervos, se podría elaborar reglas con criterio científico para reglamentar el uso de animales en cautiverio. Estas propuestas podrían tener una salida legal más efectiva y acorde que buscar otros derroteros donde la polémica y la discusión entorpecen un acuerdo razonable global.

## 9. Conclusiones finales

En un examen global de los argumentos expuestos en esta revisión, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1) Con respecto al uso del animal por el hombre:

La evidencia histórica ha puesto en relieve que el hombre siempre ha estado en relación con los animales; su utilización en la investigación biomédica no ha surgido de un capricho arbitrario de última hora.

2) Con respecto al maltrato a los animales por el hombre:

Es evidente que en siglos pasados, se han cometido abusos en muchas ocasiones desmedidos contra los animales. No obstante, en la actualidad la visión biológica coloca al hombre en un plano de semejanza global con el resto de sus compañeros vivientes, hermanos en el proceso natural de la evolución<sup>25</sup>. Esta actitud ha generado en la comunidad científica un compromiso bioético para sus congéneres animales que salvaguarda la repetición de esos sucesos.

3) Con respecto al paradigma de las tres “R”:

El desarrollo y la difusión de ideas proteccionistas hacia los animales, como la ponencia de la tríada de las “R”<sup>14</sup> ha servido en la historia de la experimentación biológica como un primer paso para formalizar el respeto bioético desarrollado por el avance tecnológico y científico de la biología. Sin embargo, la comunidad, tanto común como científica, debería considerar que las “3 R” representan solamente una recomendación idealizada básica en el diseño experimental cuya pertenencia legítima es científica.

4) Con respecto al reemplazo de los animales en la experimentación:

La complejidad de un organismo biológico, aún en su expresión más sencilla, como un microorganismo, cuya completa comprensión es incompleta, hace la propuesta de reemplazarlo por programas computacionales, obras de bioingeniería y otras proposiciones tecnológicas una oferta quimérica reduccionista muy ingenua, que revela un gran vacío en el entendimiento de la naturaleza de los sistemas vivientes.

**Declaración**

Se declara no tener conflictos de interés. Al mismo tiempo, se desea dejar en claro que las opiniones vertidas en el presente artículo son de responsabilidad exclusiva de los autores y de ninguna manera reflejan necesariamente la opinión formal de las instituciones.

**Agradecimientos**

El presente trabajo ha sido apoyado por subsidios de la Secretaría de Ciencia, Tecnología y Post-grado de la Universidad Nacional de Cuyo, y Consejo de Investigaciones de la Universidad del Aconcagua.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1) Lavallée D., Julien M. Un aspect de la préhistoire andine: l'exploitation des camélidés et des cervidés au formatif dans l'abri de Telarmachay, Junin, Pérou. *Journal de la Société des Américanistes* 67: 97-124, 1980.
- 2) Cordero del Campillo M. Sobre las relaciones del hombre con los animales. [historiaveterinaria.org/Files/Relaciones-hombre-y-animales.pdf](http://historiaveterinaria.org/Files/Relaciones-hombre-y-animales.pdf), 2006.
- 3) Taylor M. T., Murphy E., Hopkins R., Rutland P, Chistov Y. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology* 153: 1243-1249, 2007.
- 4) Von Staden H. *Herophilus: the art of medicine in early Alexandria*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1989.
- 5) Franco N.H. Animal experiments in biomedical research: a historical perspective. *Animals* 3: 238-273, 2013.
- 6) Maehle A. H., Tröhler U. Animal experimentation from antiquity to the end of the eighteenth century: attitudes and arguments. En: *Vivisection in Historical Perspective*. Rupke N.A. (Ed), Croom Helm, London, UK, 1987.
- 7) Geller M.J. Phlegm and breath. Babylonian contributions to hippocratic medicina. En: *Disease in Babylonia*, Finkel I.L., Geller M.J. (Eds), Brill, Leiden, The Netherlands, 2007
- 8) O'Malley C. D. *Andreas Vesalius of Brussels*. University of California Press, Berkeley, CA, USA, 1964
- 9) Descartes R. Animals are machines. En: *Animal Rights and Human Obligations*, 2da Ed, Regan T, Singer P (Eds), Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA, 1989
- 10) Singer P. *Animal Liberation*. Harper Collins Publishers, New York, NY, USA, 2001.
- 11) Regan T. The case of animal rights. En: *Animal Rights and Human Obligations*, 2cond ed, Regan T & Singer P (Eds), Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA, 1989
- 12) Conn P.M., Parker J.V. *The animal research war*, Palgrave MacMillan, New York, NY, USA, 2008
- 13) Liddick D. *Eco-terrorism: radical environmental and animal liberation movement*, Praeger, Westport, CT, USA, 2006
- 14) Rusell W.M.S., Burch R.L. *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London, UK, 1959
- 15) Barnes S. J., Finnerty G. T. Sensory experience and cortical rewiring. *Neuroscientist* 16: 186-198, 2010.
- 16) Kaas J. H. Somatosensory system. En: *The Human Nervous System*, Paxinos G. (ed), San Diego, Academic Press, 1990.
- 17) Mountcastle, V. B. The view from within: pathways to study perception. *Johns Hopkins Medical Journal* 136: 109-131, 1975.
- 18) Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., LaMantia A. S., White L. E., En: *Neuroscience*, 5th Edition, Sinauer Associates, Inc, 23 Plumtree Road, Sunderland, MA, U.S.A., 2012.
- 19) CIOMS-ICLAS. International guiding principles for biomedical research involving animals. Council for International Organization of Medical Sciences and The International Council for Laboratory Animal Science. <http://www.cioms.ch/index.php/component/content/article/12-newsflash/227-cioms-and-iclas-release-the-new-international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals>, 2012
- 20) Squire L. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review* 99: 195-231, 1992.
- 21) Eichenbaum H. B. Learning and memory: brain systems. En: *Fundamental Neuroscience*, 2d edition, Squire L. R., Bloom F. E., McConell S. K., Roberts J. L., Spitzer N. C., Zigmond M. J. (Editores), Academic Press (Elsevier Science, U.S.A.), New York, 2003

- 22) Ratti S. G., Cordoba P., Rearte S., Alvarez E. O. Differential expression of handedness, scalp hair-whorl direction, and cognitive abilities in primary school children. *International Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration* 4: 52-60, 2007.
- 23) Ratti S. G., Vizioli N. M., Alvarez E. O. Epigenetic modulation expressed as methylation changes in DNA from primary school children of two different geographical environments. II. *American Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration* 2: 65-70, 2010.
- 24) Ratti S. G., Vizioli N. M., Gaglio E., Alvarez E. O. Biological effects of trace elements on lateralized exploratory activity, defensive behaviour, and epigenetic DNA molecular changes in maturing rats. *American Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration* 4: 167-175, 2012.
- 25) Simpson G. G., Beck W. S. *Life: an introduction to biology*. 2<sup>nd</sup> edition, Harcourt, Brace & World, Inc, New York, U.S.A., 1965
- 26) Ferdowsian H. R., Beck N. Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. *PlosOne* 6: pp1 -4, 2011.
- 27) Gregory N. G. *Physiology and behavior of animal suffering*, Oxford, U. K., Blackwell Science, 2004
- 28) Jacobs G. A., Theunissen F. E. Functional organization of a neural map in the cricket cercal sensory system. *Journal of Neuroscience* 16: 769-784, 1996.
- 29) Murphey R. K. The structure and development of somatotopic map in crickets: the cercal afferent projection. *Development Biology* 88: 236-246, 1981.
- 30) Murphey R. K., Hirsch H. V. B. From cat to cricket: the genesis of response selectivity of interneurons. *Current Topics in Development Biology* 17: 241-256, 1982.
- 31) Kottow, M. Bienestar, dolor y sufrimiento. En: *Diccionario Latinoamericano de Bioética*, Tealdi J. C. (Director), UNESCO, Red Latinoamericana y del Caribe de Bioética, Universidad Nacional de Colombia, 2008
- 32) Balls M. Professor W. M. S. Rusell (1925 – 2006): Doyen of the three Rs. *AATEX (Special Issue)* 14: 1-7, 2007
- 33) Cochran W. G., Cox G. M. *Diseños Experimentales*. Editorial Trillas, México, 1990.
- 34) Federer W. T. *Experimental Design*. The Mcmillan Company, New York, 1955
- 35) Fisher R. A. *The design of Experiments*, 4th edition, Oliver & Boyd, Ltd., Edinburgh, 1947.
- 36) Steel R. G. D., Torrie J. H., Dickey D. A. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. 3er edition, WCB Mc graw-Hill, Boston, New York, U.S.A., 1997.
- 37) Bhatia S. N., Ingber D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology* 32: 760-772, 2014.
- 38) Covert M. W. Simulación de una célula viva. *Investigación y Ciencia* Nº 450, Marzo, 14-22, 2014.
- 39) Dorit R. L. Crear vida de la nada *Investigación y Ciencia*. *Investigación y Ciencia* Nº 450, Marzo, 23-27, 2014.
- 40) Taylor K., Gordon N., Langley G., Higgins W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *Alternatives to Laboratory Animals* 36: 327-342, 2008.
- 41) Wine L. R. *Statistics for Scientists and Engineers*, Prentice Hall Inc, Englewood Cliffs, N. J., U. S. A., 1960.
- 42) Declaración Universal de los Derechos del Animal. Liga Internacional de los Derechos del Animal. <http://www.filosofia.org/cod/c1977ani.htm>, 1977.
- 43) Mrad de Osorio A. Ética de la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 Rs de Rusell. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. *Revista Colombiana de Bioética* 1: 163-183, 2006
- 44) Rodríguez-Echandía E. L., Horno de Paci, N. *Fundamentos farmacológicos para el uso racional de medicamentos*. Ediciones Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, 1994.
- 45) Código Civil de la República Argentina.  
[http://www.oas.org/dil/esp/Codigo\\_Civil\\_de\\_la\\_Republica\\_Argentina.pdf](http://www.oas.org/dil/esp/Codigo_Civil_de_la_Republica_Argentina.pdf)