

La ética en la experimentación animal: el principio de las tres erres

Monografías do IBADER - Serie Pecuaria

Marcos Pérez López
Antonio González Mateos
María Mercedes Camiña García
David Hernández Moreno



La ética en la experimentación animal: El principio de las tres erres.

Autores: Marcos Pérez López, Antonio González Mateos, María Mercedes Camiña García, David Hernández Moreno.

A efectos bibliográficos a obra debe citarse.:

Pérez López, M.; González Mateos A.; Camiña García, M.M; Hernández Moreno. D. (2018). La ética en la experimentación animal: El principio de las tres erres. Monografías do Ibader - Serie Pecuaria 7. Ibader. Universidade de Santiago de Compostela. Lugo

Esta publicación foi sometida a un proceso de revisión por pares.

Deseño e Maquetación: L. Gómez-Orellana

ISSN edición dixital: 1988-8341

Depósito Legal: C 173-2008

Edita: IBADER. Instituto de de Biodiversidade Agraria e Desenvolvemento Rural. Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n. E-27002 Lugo, Galicia.

<http://www.ibader.gal>

info@ibader.gal

Copyright: Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvemento Rural (IBADER).

La ética en la experimentación animal: el principio de las tres erres

Marcos Pérez López

Unidad de Toxicología. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura

Antonio González Mateos

Unidad de Fisiología. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura

María Mercedes Camiña García

Dpto. de Fisiología. Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela

David Hernández Moreno

Dpto. de Medio Ambiente. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, O.A., M.P. (INIA), Madrid



Monografías do IBADER - Serie Pecuaria
Lugo 2018

Monografías do IBADER

Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvemento Rural

Temática e alcance

O Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvemento Rural (IBADER) é un instituto mixto universitario, situado na cidade de Lugo e conformado pola Universidade de Santiago de Compostela, as Consellerías da Xunta de Galicia con competencias en Medio Ambiente e Medio Rural e a Deputación de Lugo.

Unha das actividades do IBADER é a publicación e difusión de información científica e técnica sobre o medio rural desde unha perspectiva pluridisciplinar. Con este obxectivo publícanse a revista Recursos Rurais e as Monografías do IBADER, espazos orientados a fortalecer as sinerxías entre colectivos vinculados ao I+D+I no ámbito da conservación e xestión da Biodiversidade e do Medio Ambiente nos espazos rurais e nas áreas protexidas, os Sistemas de Producción Agrícola, Gandeira, Forestal e a Planificación do Territorio, tendentes a propiciar o Desenvolvemento Sostible dos recursos naturais.

A Revista científico-técnica Recursos Rurais publica artigos, revisións, notas de investigación e reseñas bibliográficas. A revista inclúe unha Serie Cursos, que publica os resultados de reunións, seminarios e xornadas técnicas ou de divulgación. As Monografías do IBADER divulgan traballos de investigación de maior entidade, manuais e textos de apoio a docencia ou investigación e obras de divulgación científico-técnica.

A revista Recursos Rurais atópase incluída na publicación dixital Unerevistas da UNE (Unión de Editoriales Universitarias Españolas) e na actualidade inclúese nas seguintes bases de datos especializadas: CIRBIC, Dialnet, ICYT (CSISC), Latindex, Rebiun e REDIB.

Política de revisión

Todos os traballos publicados polo IBADER, deben ser orixinais. Os traballos presentados serán sometidos á avaliación confidencial de dous expertos anónimos designados polo Comité Editorial, que poderá considerar tamén a elección de revisores suxeridos polo propio autor. Nos casos de discrepancia recorrerase á intervención dun terceiro avaliador. Finalmente corresponderá ao Comité Editorial a decisión sobre a aceptación do traballo. Caso dos avaliadores propoñeren modificacións na redacción do orixinal, será de responsabilidade do equipo editorial -unha vez informado o autor- o seguimento do proceso de reelaboración do traballo. Caso de non ser aceptado para a súa edición, o orixinal será devolto ao seu autor, xunto cos ditames emitidos polos avaliadores. En calquera caso, os orixinais que non se suxeiten ás seguintes normas técnicas serán devoltos aos seus autores para a súa corrección, antes do seu envío aos avaliadores.

IBADER
Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvemento Rural
Universidade de Santiago de Compostela
Campus Universitario s/n
E 27002 Lugo, Galicia (España)

Tfno 982 824500
Fax 982 824501

<http://www.ibader.gal>
info@ibader.gal

“... la libertad de elección del experimentador es a menudo mucho más amplia de lo que parece a primera vista. El uso completo de esta libertad es la marca de la experimentación humana y exitosa”

MS Russell y RL Burch

Resumen: Desde los inicios de la investigación científica, los animales han estado íntimamente relacionados con el desarrollo de los experimentos y la consecución de resultados que, a posteriori, han permitido llegar a conclusiones extrapolables a la realidad humana. Este tipo de uso de los animales ha sido, no obstante, objeto de controversia y polémicas discusiones, no solo entre los actores directamente implicados, científicos y animalistas, sino ya más ampliamente incluyendo a los reguladores, profesionales de la biomedicina, farmacología, cosmética...y, últimamente, al público en general. Esta preocupación por los derechos de los animales ha llevado a la generación de normativas internacionales orientadas a velar por el uso responsable de los mismos. Un ejemplo de ello es la Directiva 2010/63 sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos, aprobada por el Parlamento Europeo.

Como pilar fundamental para la elaboración de guías de trabajo de organismos oficiales, buenas prácticas de laboratorio, regulaciones nacionales e internacionales, etc., sigue siendo de gran importancia un término (tres en realidad) acuñado hace ya más de 50 años: el principio de las 3Rs, derivadas de los términos Reemplazo, Reducción y Refinamiento. A pesar del tiempo transcurrido desde su promulgación, siguen estando vigentes, con ligeras modificaciones, siendo de gran valor en el diseño experimental de cualquier proyecto. En la presente monografía se revisan estos conceptos en profundidad, su difusión, sus perspectivas futuras, y las repercusiones que su implantación tiene en el desarrollo de la ciencia en nuestro país.

Abstract: Since the beginning of scientific research, animals have been intimately related to the development of experiments and the achievement of results that, a posteriori, have allowed conclusions to be extrapolated to human reality. This type of animal use has nevertheless been the subject of controversy and polemical discussions, not only among the directly involved actors, scientists and animalists, but also including regulators, professionals in biomedicine, pharmacology, cosmetics ... and, lately, the general public. This concern for the animal rights has led to the generation of international regulations aimed to ensuring the responsible use of them. An example of this is Directive 2010/63 on the protection of animals used for scientific purposes, approved by the European Parliament.

As a fundamental pillar for the elaboration of guidelines by official organisms, good laboratory practices, national and international regulations, etc., a term (three in reality) coined now 50 years ago remains of great importance: the principle of the 3Rs, derived from the terms Replacement, Reduction and Refinement. Despite the time elapsed since its promulgation, they are still valid, with slight modifications, being of great value in the experimental design of any project. In the present monograph, these concepts are reviewed in depth, their diffusion, their future perspectives, and the repercussions that their implementation has on the development of science in our country.

Índice

<i>Introducción</i>	5
<i>Una breve reseña histórica</i>	7
<i>Utilización de los animales en la experimentación</i>	9
<i>Las 3rs: una pequeña reflexión</i>	13
<i>Reemplazo</i>	14
<i>Reducción</i>	18
<i>Refinamiento</i>	21
<i>Hacia una investigación más... ¿sencilla?</i>	24
<i>Unas consideraciones finales</i>	25
<i>Referencias</i>	28
<i>Casos prácticos</i>	30
<i>Preguntas</i>	32

La experimentación que se lleva a cabo mediante el uso de animales es uno de los temas más polémicos actualmente, implicando no solo a quienes son sus dos grupos más directamente afectados, científicos y animalistas, sino también a legisladores, estudiantes, opinión pública, industrias y medios de comunicación en general (Aguilar Catalán et al., 2012). La realización de experimentos con animales, entendida esta como una herramienta para avanzar en nuestro conocimiento de las ciencias, así como para poder evaluar la seguridad humana frente a la exposición a los más variados agentes químicos, ha sido un tema polémico durante muchos años. De hecho, esta cuestión suele confrontar a la mayoría de la gente (a veces incluso de forma violenta), convirtiéndose en un dilema complicado de responder. Por ello, a pesar de que se han conseguido por este medio un sinfín de indudables logros científicos, las objeciones a tales estudios, apoyándose en bases éticas y científicas, han encontrado fuerza en una sociedad cada vez más concienciada con los derechos de los animales, punto de vista amparado por el aumento de nuevos enfoques alternativos que no quieren usar seres vivos. Estos nuevos enfoques y métodos, a su vez, generan nuevas fuentes de conocimiento y, a medida que las tecnologías han avanzado, también lo han hecho los medios para compartir ese conocimiento. Internet en concreto se ha presentado como un medio extremadamente rico y versátil para el almacenamiento y la difusión de información, y eso es algo a lo que la ciencia y los científicos no podemos ni debemos escapar.

En los últimos años, y cada vez a mayor velocidad, el volumen de información se ha ampliado enormemente y el acceso a información específica puede ser extremadamente rápido y valioso, siempre que la búsqueda de esta se realice adecuadamente y el usuario sepa cómo buscarla de manera efectiva. En este ambiente propicio al debate de ideas, un reflejo de la conciencia sobre el bienestar animal en la Unión Europea ha sido una Iniciativa Ciudadana Europea (ECI, en su acrónimo anglosajón) llamada "Stop Vivisection", que fue firmada por más de 1 millón de ciudadanos europeos, y posteriormente presentada a la Comisión Europea en marzo de 2015. Esta iniciativa pedía un nuevo marco regulatorio para reemplazar la Directiva 2010/63/UE, siendo todavía más restrictiva, y eliminando absolutamente todo uso de experimentos con animales. La iniciativa también llegó a proponer que los métodos alternativos con mayor relevancia para la especie humana deberían reemplazar completamente el modelo animal y que este hecho debería quedar amparado por un marco legal. Tras mucho recapacitar y reflexionar, la Comisión Europea respondió a esta iniciativa de "Stop Vivisection", haciendo hincapié en que si bien compartía el objetivo final planteado (la sustitución completa del modelo animal), la Directiva 2010/63/UE seguía siendo necesaria (Holey et al., 2016). No obstante, tampoco sería correcto pensar que todo el mundo está en contra de la experimentación con animales (al menos no al cien por cien) sino que, siempre desde perspectivas razonadas y correctas, muchas personas ajenas al mundo académico o científico apoyarán sin dudar la utilización de animales para la realización de investigaciones básicas, el desarrollo de medicamentos eficaces y los estudios para garantizar la seguridad de los productos químicos. Seguramente su única premisa para aceptar estas investigaciones será que estas actividades sean llevadas a cabo bajo condiciones adecuadas que garanticen que los animales empleados no pasen por situaciones de miedo, angustia o incluso dolor.

Ambas posturas (a favor o en contra) pueden y deben encontrar un punto intermedio de mutua comprensión. El ya mencionado público en general, pero también el investigador, en particular, deberán responder seriamente a una serie de preguntas que quizás, durante muchos años, no han querido

plantearse: ¿es realmente necesario para llevar a cabo una investigación de calidad el uso de la cantidad de animales que se utilizan hoy en día?, ¿puede la experimentación con animales realizarse de una manera tal que los animales no sientan angustia o dolor en ningún momento del proceso? Y, ya poniéndonos en uno de los dos extremos planteados, ¿puede llevarse a cabo esa investigación sin recurrir al empleo de los animales en ningún momento y, aun así, generar resultados fiables, de alta calidad y perfectamente extrapolables a organismos vivos? Estas preguntas y muchas otras, son las que han llevado en los últimos años al auge de las 3Rs, que se desarrollarán de forma detallada a lo largo de la presente revisión.



Figura 1.- La duda es.... ¿podremos seguir utilizando animales en la experimentación en el futuro? Y, en caso de poder, ¿querremos hacerlo? (imagen tomada de Pixabay, CC0)

En toda esta discusión subyace algo esencial: existe la presunción (sobre todo por parte de muchos científicos) de que, en algún momento en el futuro, la necesidad de utilizar animales en la investigación llegará a su fin. Sin embargo, mientras dicho uso siga siendo necesario, la aceptación pública está condicionada a la comprensión de que se utilizará el mínimo número de animales y a estos se les causará la cantidad mínima de dolor, proporcionando a su vez el máximo beneficio para los seres humanos, para otros animales y para el medio ambiente. Las 3Rs, cuya denominación proviene de los términos Reemplazo, Reducción y Refinamiento (que serán explicados con detalle más adelante), proporcionan, por lo tanto, una base racional sobre la cual el uso de los animales puede seguir contando con respaldo público.

2

Una breve reseña histórica

Las 3Rs fueron promulgadas por primera vez por Russell y Burch en 1959. Sin embargo, el trasfondo ético de nuestro uso y posible abuso de animales es varios siglos anteriores. En Europa, René Descartes (1596-1650) adoptó lo que se conoce como la filosofía cartesiana: solo los humanos tienen mente, alma y conciencia. Descartes consideraba a los animales como máquinas y, como tales, incapaces de sentir dolor. La vivisección fue así ampliamente practicada en toda Europa, completamente sin anestesia. Sin embargo, esta filosofía fue cuestionada durante los años siguientes, en particular por Jeremy Bentham (1748-1832) quien, en 1789, hizo su tan citada declaración de que "la cuestión no es si los animales no pueden razonar, ni pueden hablar, sino si pueden sufrir". Asumir, por tanto, que los animales pueden sufrir conduciría a la exigencia de que los daños impuestos a esos seres vivos se redujeran entonces al mínimo y se valorara si "compensaban", al compararlos con los beneficios que cabría esperar. Esta doctrina utilitaria (esto es, que una acción es correcta en la medida en que promueve la felicidad, y que la mayor felicidad del mayor número de individuos debería ser el principio rector de la conducta humana) sigue siendo, a pesar de su relativa lejanía en el tiempo, la posición aceptada actualmente en muchas partes del mundo, y en especial en aquellos lugares donde la investigación con animales está eficazmente regulada (MacArthur Clark, 2017).

Sería casi 100 años después cuando, tras un Informe de la *Royal Commission*, Gran Bretaña aprobaría la que constituirá la primera legislación del mundo que regulase el uso de animales en la ciencia, la denominada "Ley de crueldad hacia los animales" (en su original inglés, la conocida "Cruelty to Animals Act"), en el año 1876. A partir de estas primeras reglamentaciones se establecería el uso de un sistema de licencias e inspección administrado por el Ministerio del Interior del Reino Unido. Los registros de la época de que se dispone muestran que muchos fisiólogos notables trabajaron bajo este sistema regulador, como es el caso del conocido Ernest Starling, quien solicitó el uso de perros en 1898 para de esta forma realizar una investigación que le permitiría avanzar en su comprensión del Principio de Starling, relativo al intercambio de fluidos en la sangre. El Informe Anual del Ministerio del Interior del Reino Unido de 1922 también menciona al sumamente conocido Alexander Fleming, cuyos experimentos con perros le llevaron a acuñar el término "lisozima" en un artículo de la *Royal Society* publicado en ese mismo año.

Es ya mediado el siglo XX, en 1954, cuando la Federación de Universidades para el Bienestar Animal (su acrónimo es UFAW, derivado de la forma inglesa original *Universities Federation for Animal Welfare*) nombra a los doctores William Russell, zoólogo y erudito clásico, y Rex Burch, microbiólogo, para llevar a cabo una revisión sistemática de las técnicas de laboratorio existentes en esos momentos y que recurrían al empleo de animales, dando especial relevancia a todos los aspectos relacionados con la ética del científico y de la investigación. Su informe general en 1956 incluiría la primera somera descripción de los principios de las 3Rs. Es ese justamente el núcleo a partir del que, años más tarde, surgiría su famoso libro titulado *'Principles of Humane Experimental Technique'*, precisamente publicado por la UFAW en el año 1959, y constituyendo sin lugar a dudas una pieza notablemente profética acerca de lo que habría de venir y hacia dónde irían los derroteros en esa segunda mitad del siglo XX y los comienzos del XXI, dado el estado del pensamiento ético en ese momento.

Las definiciones de las 3Rs fundamentales para Russell y Burch llevarían implícitos dos conceptos muy discutidos con posterioridad por las corrientes a favor y en contra de la experimentación con animales: la inhumanidad y su opuesto, la humanidad. La humanidad, como lo entendieron Russell y Burch, sería el objetivo final de la aplicación de la norma de las 3Rs. Sin embargo, el concepto de inhumanidad es en realidad más fundamental y básico, porque estas 3Rs buscan alcanzar la humanidad disminuyendo y, cuando sea posible, eliminando completamente la inhumanidad. De hecho, Russell y Burch analizaron detenidamente la naturaleza de la inhumanidad y luego caracterizaron a la humanidad como la ausencia de inhumanidad (Tannenbaum y Bennett, 2015). Pero estos términos no son utilizados a modo de juicio, sino que son estrictamente empíricos y descriptivos.

Y justamente en esta línea narrativa, saltando ya varias décadas, llegaríamos al siglo XXI, donde la ya nombrada Directiva 2010/63 sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos, aprobada por el Parlamento Europeo, exigiría ya explícitamente a los científicos que consideren las 3Rs en todo su trabajo profesional. El impacto de esta Directiva ha sido, por tanto, aumentar y armonizar las normas de bienestar y uso de los animales en toda la Unión Europea, situando a nuestro continente a la cabeza de estas actuaciones a nivel mundial (MacArthur Clark, 2015). Sin embargo, como es de esperar (al igual que pasa con otros aspectos más cotidianos), esta legislación (pionera en el mundo, como ya se ha indicado), no ha contentado plenamente a las ya mencionadas organizaciones contrarias al empleo de animales, y de hecho estas críticas se ejemplifican en la contundente respuesta de la Coalición Europea para Acabar con los Experimentos con Animales (ECEAE, http://www.eceae.org/a1_directive.php), que dice que todavía queda mucho por hacer, pues no todas sus exigencias irrenunciables habían sido tenidas en cuenta (Hartung, 2010).



Figura 2.- La reciente Directiva 2010/63 sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos, nos obliga a seguir unos estrictos códigos de comportamiento ético (imagen tomada de Wikimedia Commons, CC0).

A pesar de estas críticas, como investigadores, la relevancia de esta medida fue un hecho innegable, y en palabras del que en ese momento era el Comisario europeo de Medio Ambiente, el polaco Janez Potočnik, "la votación de hoy pone fin a un largo proceso de negociación, que ha demostrado cuán sensibles e

importantes son las cuestiones en juego. Sin embargo, todos hemos coincidido en que es vital mejorar la situación de los animales que aún se necesitan en la investigación científica y las pruebas de seguridad, al tiempo que se mantiene un alto nivel de investigación y se mejora el enfoque para encontrar métodos alternativos a la experimentación con animales. La Unión Europea pronto tendrá los más altos estándares de bienestar animal experimental en el mundo”.

3 Utilización de los animales en la experimentación

9

A lo largo de la historia de la humanidad, la investigación con animales ha desempeñado un papel trascendental en muchas investigaciones científicas y médicas, y continúa ayudando (entre otros muchos aspectos) a nuestra comprensión de las enfermedades humanas y al desarrollo de nuevas terapias y curas (Aske y Waugh, 2017).

El uso de animales en la investigación se remonta a épocas arcaicas, pero los registros que tenemos nos sitúan alrededor de la Grecia antigua, cuando los médicos y filósofos observadores de la naturaleza realizaban experimentos con animales vivos para comprender la anatomía y la fisiología. Personajes tan famosos como Anaxágoras, Aristóteles e Hipócrates, entre otros muchos, diseccionaron animales para conocer la estructura y funcionamiento de sus cuerpos, en un intento formidable para de esta forma conocer el mundo que les rodeaba, y por inclusión a los seres humanos. 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 (Navarro Hernández et al., 2012). En el Renacimiento surgieron nuevos intereses en el saber médico. Por ejemplo, Andreas Vesalius (1514-1564) realizó varios experimentos en especies tan variadas como monos, cerdos y cabras, de los cuales hizo dibujos anatómicos muy precisos. De hecho, sus avances le permitieron desafiar algunos de los conceptos de Galeno, vigentes hasta la época, pero ya en gran medida obsoletos. Estos estudios con animales se desarrollan enormemente en el siglo XVII, principalmente, con W. Harvey (1578-1657), quien puso de manifiesto la circulación de la sangre en 1628 (Aranda y Pastor, 2009). De hecho, a finales del siglo XVII, emergió una fuerte tradición en Inglaterra y Francia basada en la experimentación con animales, y recurriendo a una noción (ya por suerte superada en la actualidad) de que justamente los animales eran incapaces de sentir dolor. Justamente, dos fisiólogos franceses, Francois Magendie (1783-1855) y su alumno Claude Bernard (1813-1878) refutaron los métodos existentes, y postularon innovaciones, estableciendo de esta forma la experimentación y los principios científicos para experimentar con animales vivos, como una práctica común. De hecho, 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 (Navarro Hernández et al., 2012). Sin embargo, no pasaría a la historia justamente por ser un defensor a ultranza de los derechos de los animales, y frases como “el fisiólogo no es una persona normal, es un científico, un hombre absorbido por la idea científica que persigue; él ya no oye los lloros de los animales, ya no ve la sangre que derraman, solamente ve su idea y los organismos que le esconden los problemas que él desea descubrir” no hacen sino desmerecer sus logros en otros campos de la ciencia.

Dentro de esta progresión, serán justamente los siglos XIX y XX los que dejarán patentes muestras de que los experimentos con animales resultarían cruciales para el desarrollo de las ciencias biomédicas

modernas. El químico y bacteriólogo francés Louis Pasteur (1822-1895) llevó a cabo investigaciones sobre las enfermedades infecciosas en los animales domésticos y descubrió que la inmunización podía proteger de dichas enfermedades: demostró de esta forma la teoría microbiana de la enfermedad, mediante la inducción de carbunco a una oveja. Por su parte, el cirujano inglés Joseph Lister (1827-1912) declararía que los experimentos con animales habían sido de gran importancia en sus estudios sobre asepsia y antisepsia. En la década de 1890, Ivan Pavlov (1849-1936) usó perros para su conocido experimento de “condicionamiento clásico”. En 1922, la molécula de insulina sería aislada a partir de perros, lo que revolucionaría el tratamiento de la diabetes. Años después, en la década de los 70 del siglo XX; se emplearían armadillos para el desarrollo de antibióticos y vacunas para la lepra que, posteriormente, fueron usadas en medicina humana. Y en 1974 Rudolf Jaenisch (actualmente profesor de biología en el prestigioso MIT estadounidense) produciría los primeros animales transgénicos al inocular DNA del virus SV40 en el genoma de un ratón (Aguilar Catalán et al., 2012).

Pero, en general (y salvo muy honrosas excepciones), quedaba patente que los posibles derechos de los animales se habían quedado en el olvido durante todo este proceso. Y justamente ese olvido del respeto hacia los animales, aunque no ha sido exclusivo de nuestra cultura occidental, sí ha constituido parte integrante de ella, a lo que contribuiría nuestra tradición griega, romana y judeo-cristiana. En ella, la relación de los seres humanos con los animales no entraría dentro del ámbito ético, y solo se habría hecho hincapié en la tradición bíblica de considerar el mundo y los seres vivos que hay en él como seres que están bajo el dominio de nuestra especie y para su servicio, olvidando de esta forma la otra tradición- también bíblica y no incompatible con la anterior- de considerar el mundo y los animales como manifestación de la grandeza de Dios y al hombre como administrador de ella (Aranda y Pastor, 2009).

10

Pero demos un salto cualitativo al pasado siglo XX. Ya en estos tiempos tan recientes, se descubren normativas y documentos que no solo aconsejan, sino que prácticamente obligan a dicha experimentación animal. Por ejemplo, según el Código de Nuremberg, preparado después de la Segunda Guerra Mundial como resultado de las atrocidades cometidas por los nazis, cualquier experimento hecho en humanos “debe ser diseñado y basado en los resultados de investigación animal”. De hecho, en general, los nazis habían declarado como delito los experimentos realizados con animales, permitiendo sin embargo la investigación con personas “asociales”, o con algunos de los grupos étnicos, sociales o religiosos, contra los que cometieron una enorme variedad de atrocidades que tristemente todos conocemos.

Y ahondando más en esa tradición, en cierto modo impositiva, de la experimentación con animales aparece la Declaración de Helsinki, adoptada en 1964 por la XIII Asamblea Médica Mundial y revisada en 1975, y que también indica que la investigación médica en sujetos humanos “debe ser basada en la realización de ensayos de laboratorio adecuadamente realizados y en la experimentación con animales” (Cuesta y Sánchez, 2007).

Con estas consideraciones... ¿qué acontece en el campo de la investigación? En realidad, y de forma simplificada, se reconoce mayoritariamente que esta investigación con animales debe implicar tres aspectos fundamentales: la adquisición de nuevos conocimientos, el empleo de estos organismos con fines didácticos, y el ensayo de nuevos compuestos, productos químicos o dispositivos para confirmar su seguridad y eficacia. Con estas consideraciones, es obvio que cuando se realice investigación que involucre a diferentes animales, debe haber una expectativa razonable de que justamente esa ciencia contribuirá significativamente a mejorar nuestro conocimiento presente y futuro, ayudando así (como ya se ha indicado) a la protección y mejora de la salud y el bienestar de cualquier ser humano y de los animales. Entre otras (la lista no pretende ser en absoluto exhaustiva), la experimentación animal posee un enorme interés en campos biomédicos tan variados como:

La investigación biológica y médica fundamental. Esta rama sirve para desentrañar los secretos más íntimos de la naturaleza. El conocimiento sobre cómo funcionan o responden tejidos sanos, por ejemplo, permitirá predecir o entender el funcionamiento de diversas patologías. De esta forma, la

investigación básica será la base estructural sobre la que se asienten futuros descubrimientos aplicados.

El desarrollo de nuevas terapéuticas efectivas para las enfermedades, tanto mediante tratamientos farmacológicos como quirúrgicos, por ejemplo.

La obtención de diversas preparaciones a base de productos naturales utilizados en la investigación y el tratamiento médico. La generación de anticuerpos, por ejemplo, o de hormonas, en gran medida ha sido posible en los pasados años gracias al empleo de animales de experimentación.

La realización de pruebas de seguridad de los productos químicos y los medicamentos que por una razón u otra nos rodean en el día a día. Todos estos agentes, si se encuentran legalmente disponibles en la Unión Europea, han sido testados mediante los pertinentes ensayos con animales para confirmar su eficacia y su inocuidad en el consumidor final.

El estudio de diversas patologías genéticas y de pruebas diagnósticas asociadas, ya que numerosas enfermedades con componentes hereditarios pueden ser estudiadas, comprendidas y tratadas mucho mejor gracias a la realización de estudios con animales de experimentación.

Sin embargo, y a pesar de todas estas utilidades indudables, la experimentación con animales puede y debe ser afrontada intentando minimizar los daños y sufrimientos que se infligen a los animales. Además, en caso de que estos daños o sufrimientos tengan que darse, debe intentarse producirlos sólo cuando exista una causa proporcionada y perfectamente justificada, siendo la última y más aceptable causa aquella cuyo objetivo final sea el bienestar humano incontestable (pero perfectamente justificado, obviamente). Como es obvio, siempre será preferible que el daño (físico o psíquico) causado al animal de experimentación no exista o sea el menor posible, pues, a fin de cuentas, se produce voluntariamente (aunque no sea la intención que se pretende). De aquí se deriva la regla de las 3Rs, que es un tema obligado en la ética de la experimentación animal, y que pretende minimizar esos daños colaterales a los animales.

Es interesante reseñar que en toda la Unión Europea (por tanto, también en nuestro país) la ya mencionada Directiva 2010/63/UE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados con fines científicos, establece en su artículo 54 la obligación de los Estados Miembros de comunicar a la Comisión Europea cada año, antes del 10 de noviembre, información estadística sobre la utilización de los animales en los más variados procedimientos. Y dentro de la normativa nacional, resalta el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, y que de esta forma transpone la mencionada directiva. Este RD, justamente en su artículo 41.6 estipula la obligatoriedad de publicar anualmente información estadística sobre los animales utilizados en España (MAPA, 2016).

Es importante resaltar en este punto que la Directiva 2010/63/UE, en su considerando 10 reconoce explícitamente que el objetivo final buscado es el reemplazo total de los animales utilizados con fines científicos y educativos por sistemas que no impliquen el uso de animales vivos, es decir la R de reemplazo (que veremos detalladamente con posterioridad) aplicada hasta su último extremo. Entendiendo que ese objetivo final no es alcanzable a corto plazo, la norma establece la aplicación inmediata y estricta de enfoques alternativos (obsérvese que la Directiva habla de enfoques y no de métodos, porque alguno de los enfoques alternativos consiste precisamente en evitar la aplicación de métodos con animales). Dentro de estos enfoques, la normativa hace especial hincapié en el principio de las 3Rs (León y Dignoes, 2014).

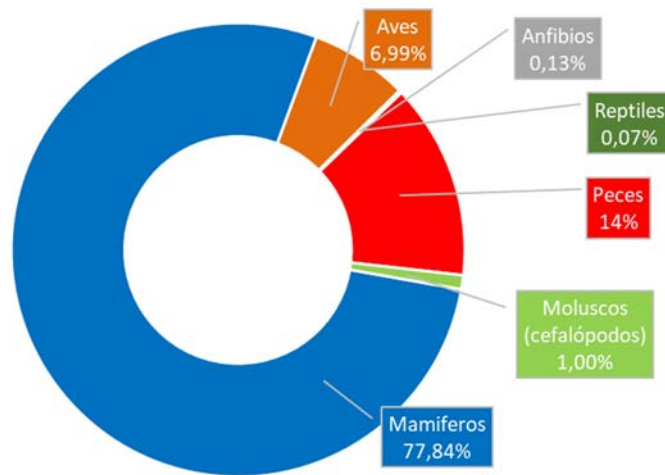


Figura 3.- Porcentajes relativos a los grupos animales más utilizados con fines experimentales en España en el año 2016 (adaptado de MAPA, 2016)

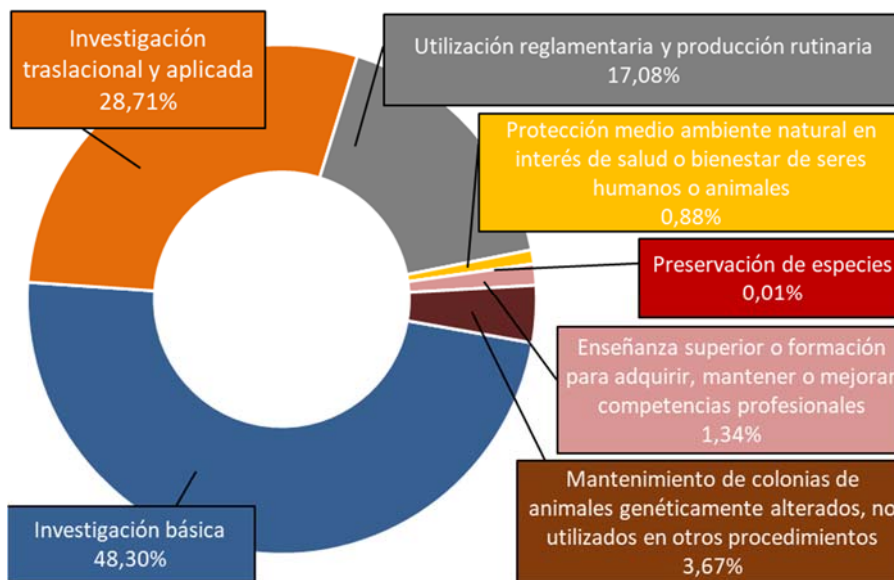


Figura 4.- Porcentajes relativos al uso de animales de experimentación según la finalidad para la que han sido requeridos en España en el año 2016 (adaptado de MAPA, 2016)

Conviene reseñar (aunque de forma muy resumida, pues esta discusión ético-filosófica podría llenar decenas de hojas) que más allá de las opiniones oficiales, en general, la actitud de una persona hacia la experimentación con animales puede clasificarse como categórica o pragmática. La posición categórica suele ser, por ejemplo, la defendida por grupos radicales activistas del bienestar animal, que justamente rechazan categóricamente la experimentación con animales, porque consideran que los animales tienen derechos iguales a los seres humanos. Frente a esta postura, el punto de vista pragmático sitúa el bienestar humano siempre por encima del sufrimiento de los animales, conllevando una justificación a ultranza del uso de animales en investigación. Sin embargo, los científicos que utilizamos o hemos utilizado animales en la investigación estamos obligados a encontrar un punto de equilibrio, sopesando el sufrimiento impuesto en los animales con la ganancia esperada en el conocimiento global de nuestra especie.

Es imprescindible, en definitiva, que los investigadores usuarios de animales, conozcan la base ética que involucra la experimentación y el manejo de los mismos, ya que este conocimiento les permitirá cumplir adecuadamente sus objetivos. Se debería entender que el uso de animales vivos no es un derecho, sino un privilegio por parte del investigador (Navarro Hernández et al., 2012).

4 Las 3Rs: una pequeña reflexión

Como ya se ha indicado, la mayor parte de las perspectivas que se le plantean hoy en día a la experimentación con animales pasan por la aplicación de la ya mencionada Regla de las 3Rs. Esta regla engloba una serie de pautas sobre las que debe sustentarse cualquier normativa o método alternativo que vaya a ser considerado, así como cualquier estudio con animales que se vaya a realizar siguiendo una metodología científica. Pero está claro que, con todo ello, los investigadores deben demostrar que existe una necesidad real para el uso de animales en la investigación que lleven a cabo, y que dicho procedimiento ha sido relevante en la elaboración de las conclusiones de un estudio concreto. Y a pesar de estas consideraciones (o lo que es mejor, además de con estas consideraciones), los experimentadores deben utilizar el mínimo número de animales, empleando métodos alternativos siempre que sea posible (Míguez et al., 2016). En todo este proceso, recordemos que la ciencia es siempre una acción humana, y que por tanto es una actividad que no está conducida rígidamente por un método algorítmico, sino gestionada por la prudencia y la creatividad que tengan las personas en ella involucradas, al igual que pasa con otras muchas actividades humanas.

13

El individuo que se encarga de generar ciencia es siempre un ser humano, con sus virtudes y defectos. Al pensar la ciencia como una acción personal orientada hacia la generación de conocimiento, el logro de un mayor bienestar y la consecución por tanto de libertad (individual, o más habitualmente, del género humano en su conjunto), se abre una caja de pandora llena de nuevos problemas. En especial, se hacen evidentes los dilemas éticos que la investigación científica comporta. Y está claro que, cuando se trata de experimentación animal y/o de investigación clínica sobre seres humanos, la ciencia ha de aceptar ciertos controles éticos. Pero, por otro lado, la autonomía de la ciencia es, sin duda, un valor deseable y a perseguir siempre (la Historia ya nos ha mostrado incontables veces los desastres que surgen cuando la ciencia está orientada o dominada por los poderes que cada época ha tenido).

En definitiva, el problema consiste en lograr un equilibrio aceptable, de modo que la autonomía científica sea respetada, y los valores éticos, también (Marcos, 2014). Es en este proceso de búsqueda de un correcto equilibrio donde viene a asentarse la regla de las 3Rs, cuyo fin último es posibilitar al mismo tiempo el desarrollo de la investigación científica y el respeto hacia los animales en ella utilizados. El principio de las 3Rs, uno de los ejes básicos del concepto de protección animal en la investigación, plantea un nuevo esquema de investigación científica en el que el uso de animales debe ser la última opción considerada, cuando todas las otras hayan mostrado ser ineficaces. Así pues, sus tres epígrafes básicos (la reducción, el refinamiento y el reemplazo) deben conducir al quehacer científico a crear nuevos métodos y sistemas en los que no se requiera un modelo animal o, de requerirse, quede reducido a su mínima expresión y siempre mejorando en todo lo posible su calidad de vida (Romero-Figueroa et al., 2017). Veamos pues, detalladamente, en qué consisten los tres epígrafes en que se sustenta.

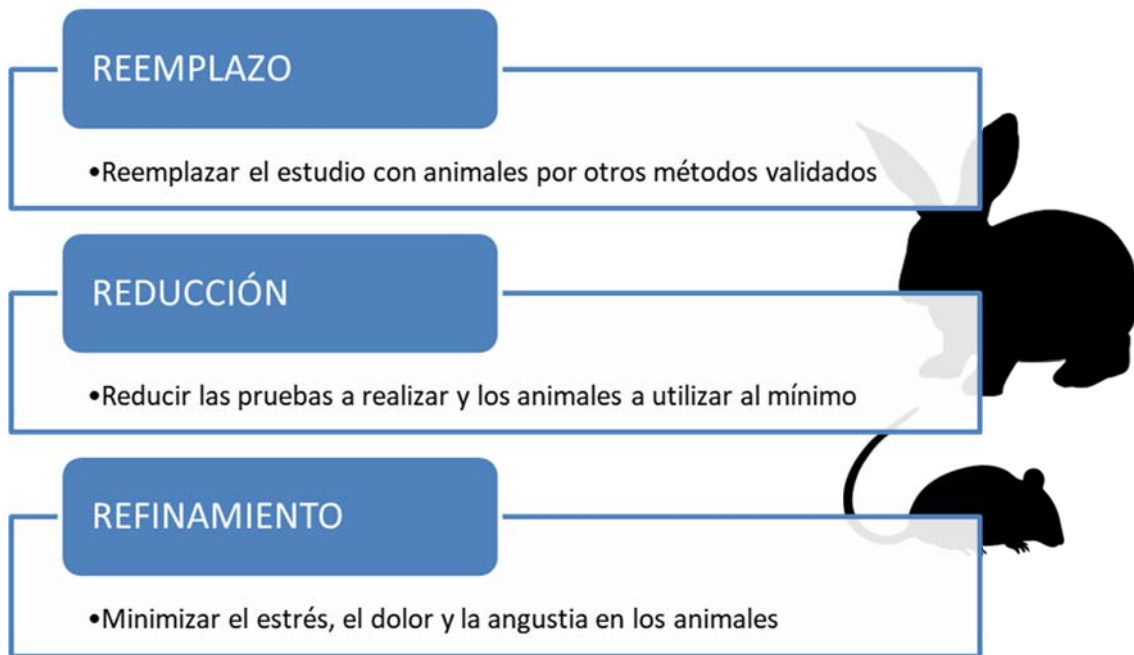


Figura 5.- Esquema de las tres apartados que constituyen el principio de las 3Rs

5 Reemplazo

El reemplazo goza de una posición particular entre los 3Rs. De hecho, fue la primera de las 3Rs presentadas por Russell y Burch, lo que refleja el orden previsto en el que se consideraron estos tres principios. De hecho, las preguntas que se puedan plantear sobre las otras dos Rs, reducción y refinamiento, solo serán realmente relevantes si la primera de ellas, el reemplazo, ha sido considerada y descartada con total seguridad en los primeros momentos de la reflexión científica. Por otra parte, el objetivo de reemplazo también ha recibido un amplio apoyo por parte de la comunidad científica, en parte porque es el único objetivo de los tres que es totalmente compatible con la perspectiva del mantenimiento de los derechos de los animales empleados para investigación que tenga como perspectiva el beneficio humano. En este sentido, el reemplazo es probablemente la más fácil de las 3Rs para comunicarse de una forma sencilla y convincente al gran público: una frase del tipo de "no probado en animales" insertada en un producto manufacturado es un mensaje muchísimo más poderoso que el decir "probado en menos animales" o "probado en animales que experimentaron menos angustia". Además de las implicaciones comerciales que todos podemos entender fácilmente, las repercusiones científicas de este hecho son innegables. Los modelos de reemplazo a menudo ilustran innovaciones técnicas y científicas, generalmente como resultado de años o décadas de desarrollo, algo que sin duda ayuda a aumentar su "encanto" y la facilidad con que son aceptados por el público en general (Olsson et al., 2012). Pero tampoco nos llevemos a error pensando que por ello el reemplazo sería la panacea en el mundo de las 3Rs: recientemente, sin embargo, los científicos han comenzado a tomar conciencia del riesgo potencial que supone la sobrevaloración del reemplazo.

La política y la planificación para la investigación biomédica variarán dependiendo de cuán realista se perciba la opción de reemplazo completo. Los seguidores de los movimientos más estrictos contra el empleo de los animales en la experimentación a menudo sostienen que el reemplazo completo es algo inminente, al menos en nuestro continente. A ello contribuyen las numerosas opciones tecnológicas de que disponemos en la actualidad, y que antes no estaban disponibles: cultivos de células y tejidos humanos, microdosificación de fármacos, tratamiento de imágenes y análisis sofisticados, modelos informáticos, ... Con ello no se quiere negar lo evidente: la preeminencia del reemplazo sobre las otras dos Rs es clara, incluso en las políticas de las agencias de financiación de la investigación europea. Por ejemplo, los Programas Marco de la Comisión Europea (el instrumento conjunto empleado para financiar la investigación colaborativa en la Unión Europea) instan a los solicitantes de subvenciones para desarrollar investigaciones a que tengan siempre en cuenta los principios de las 3Rs, pero sin embargo el reemplazo es prácticamente el único que recibe un financiamiento específicamente otorgado.

Por otra parte, los científicos que trabajan con animales de laboratorio en la Unión Europea son realistas, y a menudo afirman que estos animales todavía se usan en grandes cantidades y que es probable que este uso continúe en los años próximos. Un destacado experto en las 3Rs declaró recientemente que "los animales completos son indispensables en la investigación, ya que surcamos todavía aguas científicas desconocidas y nuevas ... no hay reemplazo para estos animales, pues aún no sabemos qué puede reemplazarse" (Fosse, 2010). Para quienes adoptan esta visión pragmática, el trabajo continuo sobre reducción y refinamiento sigue siendo tan importante hoy como lo fue para Russell y Burch en 1959. En todo caso, conviene recordar que entre estas las dos posturas (a favor y en contra del uso de animales) enfrentadas, también se palpa un marcado desacuerdo moral, que influye en la perspectiva que se aplica hacia el reemplazo: estrictamente este se basa en no usar los animales, bajo ningún concepto, mientras que tanto la reducción como el refinamiento están más en la línea de que bajo ciertas condiciones o situaciones, estaría bien usar animales, siempre que se haga por una buena razón y se vele en todo momento por el bienestar de los animales en la medida de lo posible. Por tanto, estas dos últimas opciones, en muchas ocasiones, no son en absoluto aceptadas por los detractores del empleo de animales para la experimentación.

El campo del reemplazo es por todo ello seguramente el más activo en los últimos tiempos (Pardo, 2005). Por una parte, y como es de imaginar, la gran presión de los grupos contrarios al empleo de animales en experimentación ha forzado a la búsqueda de dichos procedimientos. Por otra parte, también ha influido la negativa científica a aceptar la fiabilidad para el ser humano de los resultados obtenidos en animales. Por último, el crecimiento del alumnado en las Facultades de Ciencias, Veterinaria y Medicina, ha hecho necesario buscar métodos de prácticas que familiaricen a los alumnos con los animales, su anatomía, fisiología, etc., sin verse obligados a emplear gran número de ellos. Todo ello porque, recordemos, como su propio nombre indica, el reemplazo busca el uso de métodos alternativos a la realización de experimentos con animales.

Dentro de las alternativas contempladas en la actualidad en el amplio campo del reemplazo, se encuentran los ensayos *in vitro* e *in silico*. Y entre los ensayos *in vitro* se incluye la experimentación con líneas celulares derivadas de diversos tejidos de organismos vivos o cultivos primarios (por ejemplo, hepatocitos, fibroblastos, o construcciones tridimensionales como los esferoides)... Este tipo de sistemas permite obtener información de gran relevancia sobre modos de acción específicos, pero tiene el problema de la extrapolación directa y realista de los efectos obtenidos *in vitro* al organismo vivo. Por otro lado, los sistemas *in silico* son herramientas informáticas predictivas que permiten conocer, o al menos generar una aproximación sobre el efecto en diferentes organismos de sustancias potencialmente nocivas. No obstante, hay que ser realistas: los sistemas *in silico* necesitan nutrirse de datos, generados a partir de ensayos *in vitro* e *in vivo*. No es por tanto una tarea sencilla la sustitución de la experimentación animal, ya que en general un método acorde con esta R pocas veces vale por sí solo para sustituir completamente a un experimento específico con animales (al menos, a día de hoy, con los conocimientos y medios de que

disponemos). Sin embargo, nadie duda que poco a poco la combinación de varios métodos de experimentación alternativos podría dar como resultado un banco de información suficiente para hacer que la experimentación clásica con el animal llegue a ser innecesaria.

Pero con todas estas consideraciones... ¿el reemplazo es adecuado y razonable? Todo él se basa en la idea de que hay una ganancia ética al pasar de organismos "superiores" a "inferiores" evolutivamente. Si esta idea no se acepta, el proceso de razonamiento surgirá lastrado, y el reemplazo en sí mismo carecerá de sentido. Este cambio de razonamiento (que podríamos decir "de aceptación evolutiva") queda explícito en la legislación europea, que requiere que los científicos, al seleccionar entre procedimientos disponibles, elijan aquellos que "involucran a los animales con la capacidad más baja para experimentar dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero" (artículo 13.2) (Unión Europea, 2010). Este pensamiento podría considerarse intuitivamente correcto si aceptamos que un procedimiento llevado a cabo en un animal con menos capacidad para experimentar dolor resultaría en menos daño que el mismo procedimiento llevado a cabo en un animal con más capacidad para sufrir (algo que seguramente una persona en total desacuerdo con la experimentación animal nunca llegará a aceptar). El problema que debemos afrontar y estudiar como científicos es que no existe una forma clara de definir la capacidad de experimentar dolor, sufrimiento o angustia en todos los animales, y este es un aspecto que debe ser en los próximos años (Olsson et al., 2012). De hecho, como una forma de "esquivar" este vacío, las clasificaciones existentes en la actualidad para evaluar la experiencia del dolor/sufrimiento, en vez de reflejar la capacidad de sufrir del animal implicado, parecen en cambio relacionarse más con la escala socio-zoológica a la que este pertenece (Arluke y Sanders, 1996). Esta escala del sufrimiento se basa en cómo perciben el dolor los seres humanos, pero también en consideraciones bastante subjetivas. Siguiendo esta clasificación, entre las especies de vertebrados utilizadas para la investigación, la jerarquía comienza con los grandes simios (en la parte superior de la escala, muy próximos a los seres humanos), seguidos de otros primates no humanos, perros y gatos, cerdos, etc., poniendo al final de la clasificación a los roedores y los peces. Esto no quiere decir que la escala socio-zoológica carezca de relevancia moral, pero, para las personas más enfocadas en el bienestar animal o el respeto por los animales, esta no es una consideración especialmente relevante y, por tanto, la escala es totalmente criticable.

Superando estas críticas, y siguiendo este epígrafe de "reemplazo", siempre que sea posible, los animales vivos deben ser sustituidos por alternativas que no sientan o que sientan menos que un animal entero, como es el caso de los ya mencionados cultivos celulares, invertebrados o modelos matemáticos. Por esta razón, el progreso efectivo en el reemplazo generalmente debe ser dirigido por científicos que tengan una comprensión íntima de su tema en particular y puedan evaluar la idoneidad de las opciones de reemplazo específicas. Sin embargo, las nuevas tecnologías han introducido opciones que pueden tener una aplicación más genérica. Por ejemplo, los sistemas biológicos no mamíferos, como los insectos y los gusanos nematodos, se utilizan cada vez con más frecuencia para estudiar la biología básica en enfermedades como la diabetes y la obesidad.

La capacidad de generar cultivos celulares complejos, que incluyen tecnologías de células madre, enfoques tridimensionales (3D) e ingeniería de tejidos, contribuye a un mejor modelado del sistema *in vitro*. Incluso el conocido ensayo de mutagenicidad de Ames, ya ha sido parcialmente reemplazado por métodos alternativos perfectamente validados (Madden et al., 2012). De hecho, en la actualidad se están llevando a cabo grandes progresos en la validación de protocolos de experimentación con células, de cara a poder demostrar su utilidad absoluta para el reemplazo. Por ejemplo, la utilización de capas de células cultivadas para construir un tipo de piel artificial que se puede utilizar para la evaluación del efecto tóxico de sustancias nocivas, algo que es de sumo interés para la industria cosmética, se ha aceptado como método válido para la sustitución de los ensayos de toxicidad cutánea en conejos o cerdos, tan denostados por el público en general (y por muchísimos científicos concienciados con esta problemática, también). No obstante, debemos ser realistas y constatar, por ejemplo, que como ya se ha indicado la investigación usando células, tejidos u órganos aislados también tiene sus limitaciones, ya que hay muchos fenómenos complejos del

cuerpo intacto que no pueden ser investigados (una célula no puede experimentar vómitos, o temor, por ejemplo...).

Hay que destacar que las tecnologías de reemplazo a menudo han permitido a los científicos realizar experimentos que no serían posibles en modelos animales clásicos, lo cual ha abierto nuevas ventanas para el avance de la ciencia. Por ejemplo, los descubrimientos recientes en micro-fluidos han creado la tecnología humana denominada 'gut-on-a-chip' (intestino en un chip, podría ser su traducción al español) que proporciona un microambiente donde poder imitar las condiciones naturales de los intestinos humanos en una plataforma *in vitro* a pequeña escala (Kim y Ingber, 2013). Esto ha permitido el co-cultivo de células intestinales con microbios vivos de la flora microbiana normal y anormal durante un período de tiempo prolongado. Más recientemente, se ha demostrado que esto también puede proporcionar un modelo *in vitro* adecuado para el estudio de la infección por virus entérico y de la patogénesis del enterovirus. Todos podemos entender fácilmente que ninguno de estos estudios sería factible en modelos animales o sistemas de cultivo celular estático, más tradicional.

También los nombrados avances en métodos computacionales y modelos matemáticos ofrecen nuevas y apasionantes opciones para estudios nutricionales y de metabolómica humana a gran escala, que involucran la obtención y el estudio de un conjunto de datos extremadamente prolífico y complejo (Bijlsma et al., 2005). Aunque, como ya se ha mencionado, muchos de los datos ahí recogidos procedieron de estudios previos con animales *in vivo* que generaron resultados de menor valor que el estudio de la especie humana objetivo.

Es importante por ello resaltar que el desarrollo y la implantación de métodos de reemplazo adecuados, seguramente generen al comienzo un uso todavía mayor de animales que el que se deseaba reemplazar. Este hecho es así por la necesaria reproducción de todos los ensayos, para asegurar la absoluta validez del método a desarrollar, eliminando cualquier posibilidad de duda o de fallo futuro. Pero es solo una etapa transitoria que ha de ser aceptada, y una vez desarrollado y validado el nuevo método, es indudable que el reemplazo será perfecto para nuestro procedimiento de acuerdo con los principios de las 3Rs.

Test de toxicidad aguda:	Reducción del número de animales usados, Test de efecto citotóxico
Test de irritación conjuntival	Test de efecto citotóxico, test metamórfico de proteína...
Test primario de irritación dérmica	Test de efecto citotóxico, modelo tridimensional de piel cultivada
Test de permeabilidad de la piel	Método de piel aislada
Test de fototoxicidad	Test de efecto citotóxico, método de oxidación de la histidina,...
Test de sensibilización de la piel	Método de células de piel humana cultivadas, test de células Langerhans cultivadas,
Test de mutagenicidad	
Test de carcinogenicidad	Test a corto plazo, test de mutagenicidad celular, test de proliferación de peroxisomas
Test de toxicidad reproductiva	Test de embriones cultivados

*Los ítem en negrita indican investigaciones particularmente activas.

Tabla 1. Principales áreas de investigación en la que se están buscando métodos alternativos a la experimentación animal (adaptado de Omoe, 2006)

6

Reducción

Una vez asumida la relevancia del reemplazo, la reducción del número de animales utilizados en la investigación es una imperiosa necesidad, tanto ética como económicamente. Sin embargo, los científicos tienen que asegurarse de que el número de animales utilizados no se reduce a un punto tal en que los datos ya no pueden soportar un análisis estadístico significativo. De lo contrario, los resultados carecerían de validez y las pruebas deberían repetirse, lo cual al final iría en contra del principio buscado con la aplicación de las 3Rs. Por tanto, la tarea principal y más complicada en la reducción es determinar el número óptimo de animales de experimentación por grupo en un ensayo dado. Con estas consideraciones, es seguramente el término más importante dentro de las 3Rs, al menos en la actualidad que nos rodea. Sin embargo, la relevancia que hoy se le da no siempre fue así: durante muchos años, se reconoció por parte del mundo científico que reducir al mínimo el número de animales utilizados en la experimentación podía no ser lo mejor para los resultados éticos y de bienestar, haciendo que justamente esta R fuera de las más infravaloradas (o al menos no tan considerada como su predecesora). Por una parte, como ya se ha indicado, se consideraba (no sin razón) que el empleo de muy pocos animales en una investigación podría conducir a resultados que serían estadísticamente difíciles o imposibles de interpretar con precisión.

18

En segundo lugar, generalmente se considera que el daño a cada animal individual debe reducirse al mínimo, incluso si esto significa utilizar un mayor número de animales. Por lo tanto, se debe lograr un equilibrio entre minimizar el número total, pero al mismo tiempo asegurando que se obtienen resultados fiables (y esto incluye evitar un daño para las personas, por ejemplo, al obtener datos erróneamente interpretados). Por ello, como se ha indicado, este apartado era (y en gran parte sigue siendo) muy discutido. Pero partiendo de esta dificultad inherente, el enfoque contemporáneo de la reducción se centra especialmente en mejorar y optimizar el diseño experimental y, al mismo tiempo, en garantizar que los resultados sean reproducibles, siempre que sea posible (MacArthur Clark, 2017). Es interesante resaltar una revisión realizada acerca de los experimentos con animales y publicada en 2009, en la que se concluyó que había grandes discrepancias en la mayoría de los artículos considerados (Kilkenny et al., 2009). Esto condujo a la publicación de las directrices de Investigación Animal: Informes de Experimentos *in vivo* (ARRIVE en su formato inglés, a partir de *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*). En ese trabajo se proporciona una lista de verificación de veinte elementos que eran necesarios para maximizar la validez interna, la reproducibilidad y el contexto de un documento científico. Estas directrices son extremadamente relevantes, de tal forma que han sido respaldadas por más de 1000 revistas internacionales.

En la búsqueda del menor número de animales posible empleados, siempre obviamente en consonancia con el logro de los objetivos del estudio propuesto, conviene que colabore con el investigador un experto en estadística, pues muchas veces se escoge el número de animales para cada grupo de experimentación de modo más o menos arbitrario (6, 10,...) sin que se sepa justificar el porqué de esa cifra (Liebsch et al., 2011). En este sentido, es importante la opinión de las agencias y organizaciones de carácter gubernamental. Seguir los protocolos de trabajo en investigación que organizaciones como la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) publican sin duda llevará a posibles lectores a confiar en los resultados publicados. Además, facilitará el trabajo de los investigadores en los primeros pasos de cualquier diseño experimental, dado que, en relación con la reducción, establece el número

mínimo de individuos con el que obtener resultados fiables y estadísticamente evaluables. En el caso de la evaluación del efecto tóxico de sustancias químicas en organismos acuáticos, por ejemplo, se establece la posibilidad de realizar un ensayo límite, utilizando un único grupo de peces expuesto a una sola concentración umbral, a partir de la cual, si no genera muerte, se considera que la sustancia es segura y no haría falta continuar ensayando concentraciones inferiores, cada una de las cuales requeriría un número nada desdeñable de peces (OCDE nº 203, 1992): los parámetros que busca la reducción habrían sido cumplidos de una manera magistral.

A primera vista, la reducción debería ser un objetivo claro y fácil de medir, ya que después de todo, y dicho de una forma muy simplista, es simplemente una “cuestión de contar”. La reducción obviamente se relaciona enormemente con el reemplazo, ya que cada prueba animal reemplazada por una alternativa no animal representa una reducción en el número de animales utilizados. Desafortunadamente, los datos disponibles indican que tras varios años programando correctamente en este campo, desde hace algún tiempo ya no hay un progreso real en la reducción del número total de animales utilizados en Europa para la investigación. Esta evidencia es tomada por algunos críticos del uso de animales como un indicador de que no hemos logrado adecuadamente el objetivo de reducción, o de que no hemos sabido aplicarlo correctamente (Olsson et al., 2012).

En este punto, conviene hacer un pequeño inciso: en la reducción del número de animales entran también consideraciones de carácter pragmático: emplear el número adecuado de animales es más barato (no empleamos animales de más), el trabajo del manipulador se reduce al mínimo (ese tiempo precioso puede ser dedicado a otros menesteres), y tenemos al mismo tiempo la seguridad, independientemente de que verifiquen o no nuestra hipótesis, de que vamos a obtener resultados (Madden et al., 2012).

La reducción también tiene otra dimensión en el sentido de que es deseable reducir el número total de experimentos que se llevan a cabo. En este contexto, el intercambio de datos es un medio importante para evitar la duplicación de pruebas en la investigación, donde a menudo los resultados de los ensayos son propiedad comercial, y la necesidad de confidencialidad a veces puede conducir a una poco constructiva duplicación de las pruebas. En la investigación básica, por ejemplo, la duplicación puede ocurrir cuando los investigadores interesados en una cierta hipótesis desconocen que un experimento particular relacionado con ella ya ha sido realizado por otros investigadores, y de hecho se han presentado numerosas reclamaciones en este sentido. Asegurar que los resultados de la investigación se compartan de forma generosa tanto como sea posible es indudablemente una forma muy útil de reducir el número total de animales involucrados en la investigación. La principal forma en que los datos se comparten actualmente es mediante la publicación de investigaciones en revistas revisadas por pares. Sin embargo, no todas las investigaciones realmente realizadas se publican. En concreto, algunos investigadores argumentan que sería deseable asegurar una mayor disponibilidad de informes de resultados de investigación “negativos” o fallidos (nadie o casi nadie quiere y/o puede publicar estos resultados negativos). Pero, por ejemplo, los resultados procedentes de proyectos de investigación subvencionados por organismos nacionales o internacionales deben ser entregados en forma de informes a dichas organizaciones, siendo común que los pactos de confidencialidad o el mero hecho de la propiedad intelectual relegue dichos resultados a permanecer durante años ocultos a ojos del público en general. Y aquí conviene hacerse eco de una colección de revista muy trascendentes, agrupadas bajo el epígrafe “The All Results Journals” (<http://www.arjournals.com/>), que, basadas en la premisa de que más del 60% de los experimentos científicos no producen resultados o descubrimientos esperados, pero que este alto porcentaje de investigación “fallida” genera conocimiento de alto nivel, su objetivo principal se centra en la recuperación y publicación de dichos resultados negativos, una clave vital para el desarrollo de la ciencia y el catalizador de un verdadero conocimiento empírico de nuestro entorno. Este entorno, y otros similares, deberían ser empleados y consultados muy frecuentemente dentro del denso campo de la reducción.

También la armonización internacional de las guías de ensayo es fundamental, ya que muchas pruebas con animales se realizan para proporcionar datos de seguridad o eficacia a las autoridades reguladoras, de

conformidad con la legislación nacional o internacional. Si diferentes autoridades requieren que las pruebas se lleven a cabo utilizando sus propios diseños de estudio específicos, una sola sustancia química que se comercialice en varios países podría necesitar ser analizada varias veces en busca de efectos negativos, terapéuticos.... La armonización de los protocolos de ensayo, para que un diseño experimental único sea aceptable para las autoridades reguladoras en muchos países, indiscutiblemente es un medio muy valioso para reducir la cantidad de animales utilizados en las pruebas de seguridad y eficacia en todo el mundo. Así mismo, la armonización tiene muchas ventajas: además de la ya mencionada de reducir la necesidad de repetir las pruebas, permite eliminar el requisito de redundancia en los experimentos (donde más de una prueba proporciona la misma información); minimizar los tamaños de grupo (por ejemplo, mediante el acuerdo de usar un solo sexo) y conducir a la adopción de protocolos abreviados, números de animales reducidos y tratamientos y procedimientos menos severos (NCBI, 2005).

Con todas estas consideraciones, algunos de los métodos adecuados para aplicar correctamente el principio de reducción pueden ser, entre otros:

Realización de estudios piloto: estos constituyen una buena forma de reducir el número de animales utilizado; usándose para estimar la variabilidad y evaluar procedimientos y efectos. Realizados con poca cantidad de animales, permiten ganar confianza con el material experimental y a la vez permiten que el personal vaya adquiriendo destreza en las manipulaciones.

20

Uso apropiado de los puntos finales (*endpoints*): La precisión de un experimento depende principalmente del tamaño de la muestra y de la varianza del error. Es necesario prestar cuidadosa atención al tipo de criterio de valoración utilizado. Los criterios de valoración cualitativa (por ejemplo, valorar solo si el animal está muerto/vivo) a menudo implican dolor y angustia severa, y generalmente proporcionan menos información que las mediciones cuantitativas.

Compartiendo animales: en algunos casos, es posible compartir los animales de investigación. Por ejemplo, los animales sacrificados por un investigador pueden proporcionar tejidos para su uso por otro investigador. Hay casos en los que esto no debe intentarse (por ejemplo, animales que han estado expuestos a riesgos biológicos o ADN recombinante), pero es un método para reducir el número de animales que debe ser explorado por los investigadores.

Autocontroles: sería útil, siempre que sea posible, diseñar experimentos en los que los animales sirven como su propio control. Por ejemplo, si un procedimiento se debe realizar en una extremidad, en lugar de hacer el procedimiento en ambos miembros de un animal y tener controles en animales separados, se podría hacer un procedimiento unilateral con el control en el miembro opuesto.

Empleo y desarrollo de nuevas instrumentaciones y técnicas: emplear metodologías innovadoras que pueden mejorar la precisión puede reducir el número de animales necesarios para un estudio. Esto tiene el beneficio añadido de ser también una técnica de refinamiento para el protocolo.

Establecer un diseño experimental apropiado: realizar un cuidadoso diseño experimental mediante la elección adecuada de los grupos control y los procedimientos de normalización para minimizar las variabilidades una labor fundamental que todo investigador debe plantear antes de iniciar el procedimiento en sí.

7 Refinamiento

Después de ver a sus dos predecesores, vamos con el tercero de los términos, a veces complejo de evaluar. El refinamiento engloba a todos aquellos procedimientos que pretenden minimizar el sufrimiento o la ansiedad de los animales empleados en la experimentación (antes, durante y después de ella), o a los procedimientos que cambian una especie por otra con menor capacidad sensitiva. Este epígrafe se basa por tanto en un principio genéricamente aceptado: aunque podría estar justificado infligir un dolor, angustia o daño duradero a algún animal por el bien del ser humano, este daño es algo completamente contra natura para el animal y, por tanto, debería ser minimizado. Esa labor de minimizar el sufrimiento o la angustia del animal es la delicada y a la vez complicada tarea de refinar la experimentación. Existe un principio subyacente en todo ello y es el que establece que un pobre (entendido como escaso) bienestar está en desacuerdo con la consecución de una buena ciencia. Por lo tanto, además de nuestras obligaciones éticas para optimizar el bienestar del animal de experimentación, el fundamento científico para el refinamiento es un criterio totalmente persuasivo para convencer a los investigadores de su utilidad. Con todas estas consideraciones, el refinamiento incluirá por ejemplo nuevas tecnologías *in vivo* que minimizan el dolor o la angustia experimentada por los animales, así como el desarrollo de toda una batería de nuevos métodos que ofrecen mejoras en el cuidado, la manipulación y el uso de los animales. Si bien son innumerables las posibilidades que este capítulo abre, por enumerar algunos de los muchos puntos donde se debe trabajar es posible destacar los siguientes (Pardo, 2005):

21

Empleo de equipamiento adecuado (que no someta al animal a molestias innecesarias), así como entrenamiento y experiencia correctos de los experimentadores (en todo momento deben saber reconocer y paliar correctamente los efectos adversos del experimento que observen en los animales).

Empleo de animales situados más abajo en la escala filogenética, que puedan experimentar menos el dolor o las molestias, es decir, que tengan una sensibilidad más primitiva (por ejemplo, cuando el objetivo de la investigación así lo permita, emplear insectos en vez de mamíferos). Pero recordemos que justamente este aspecto, como ya sea visto, puede ser criticable desde varias perspectivas.

Empleo de animales expresamente criados en cautividad para la experimentación: es de esperar que estos animales experimenten menos molestia psicológica al verse en cautividad, pues no han vivido en su medio silvestre, frente a aquellos que hayan tenido siempre una vida más o menos en libertad. Si no es posible emplear estos animales criados expresamente, deberá intentarse que se trate de especies fáciles de obtener y que no necesiten largos transportes o verse sometidos a cuarentenas prolongadas, y que obviamente puedan mantenerse en esas condiciones de cautividad sin suponer para ellos un enorme sufrimiento. Sin embargo, es fácil entender que el criar animales específicamente para ser usados en experimentación será un punto de confrontación claro con los grupos animalistas más estrictos).

Llevar a cabo procedimientos de estabulación adecuados a cada especie animal, que permitan un comportamiento lo más similar posible al que suele observarse espontáneamente en su especie: espacio, temperatura, objetos presentes en el entorno, etc.

Enriquecimiento de los ambientes donde viven los animales de forma adecuada, no haciendo que los animales vivan toda su vida exclusivamente rodeados de paja o viruta. Los primates necesitarán sitios donde encaramarse y jugar, los roedores y lagomorfos, lugares donde poder sentirse cobijados y ocultos....

Disponer el alojamiento de los animales sociales, tales como ratones y ratas, junto con otros animales de su especie, evitando los aislamientos sociales, que van a generar sufrimientos y comportamientos anómalos, lo que a su vez provocará resultados indeseados de las investigaciones.

Realizar siempre un examen crítico de los procedimientos elegidos y, dentro del empleo de animales que se haya visto imprescindible, seleccionar las alternativas que causen menos dolor, molestias o ansiedad.

Retirar los alimentos y el agua sólo por periodos estrictamente limitados, y tan solo cuando sea absolutamente necesario.

Procurar que la muerte espontánea del animal no sea el punto final del experimento; antes bien, establecer una serie de signos de deterioro de su estado de salud y prever un procedimiento indoloro de eutanasia cuando sea necesaria.

No dejar que los tumores crezcan en el animal a un tamaño exagerado.

Disminuir los efectos secundarios de los procedimientos empleados mediante el empleo de métodos de anestesia, analgesia postoperatoria, por ej., si la naturaleza del experimento lo permite.

Entrenar a los animales para someterse voluntariamente a procedimientos no invasivos mientras están conscientes (procedimientos que obviamente el investigador haya ensayado previamente y sepa con total certeza que no son causa de sufrimiento para el animal).

Un ejemplo práctico se asocia a los avances logrados recientemente en las técnicas bioanalíticas, lo que ha abierto la posibilidad de utilizar volúmenes de muestra más pequeños (micromuestras) de sangre, plasma o suero. Ello hace posible que sea posible evaluar los niveles circulantes de drogas u otros agentes químicos en el animal, y medir los parámetros bioquímicos sanguíneos, a partir de muestras tan pequeñas como 5-20 µL. Este hecho es de enorme relevancia por ejemplo en el caso de los pequeños roedores de laboratorio, pues va a permitir tomar muestras de un mismo animal muchas veces a lo largo de un mismo experimento, evitando el uso de un gran número de animales (poniendo en práctica, por tanto, otra de las 3Rs). Además, el refinamiento se manifiesta en una menor manipulación del animal. Dado que este epígrafe está destinado a evitar el sufrimiento animal en la medida de lo posible, la anestesia y la analgesia se deben usar como parte integrante de protocolos experimentales invasivos, para gracias a ellos minimizar el dolor o la angustia experimentada por los animales, obviamente siempre y cuando no interfieran con el desarrollo del experimento. Todo el personal implicado debe ser entrenado correctamente para reconocer signos de dolor y angustia en las especies relevantes y, de hecho, este es un apartado de gran relevancia en los actuales cursos de capacitación que se desarrollan en España, de acuerdo a la legislación vigente.

Es interesante resaltar algo específico en este apartado: el simple manejo rutinario de los animales para la cría y para el desarrollo de los procedimientos menores también pueden ser una fuente de estrés profundo que puede alterar los resultados de la investigación. En concreto, por ejemplo, se ha visto que el método tradicional generalmente aceptado de sostener a los ratones por la cola les induce aversión y una alta ansiedad, mientras que el uso de la mano abierta o la creación de "túneles" donde puedan sentirse parcialmente tranquilos, independientemente de la familiaridad previa, hace que los animales se acerquen "voluntariamente" y con poca ansiedad (Gouveia y Hurst, 2013).

Y justamente por todo lo anteriormente indicado, al aspecto ético del refinamiento en el empleo de animales para la investigación, conviene añadir otro aspecto de extremo interés, el de la validez de los resultados científicos: el tener a los animales libres de estímulos dolorosos o generadores de ansiedad, permite al

científico tener más seguridad de que los resultados que van a ser obtenidos se deben al procedimiento experimental investigado de por sí, y no a una reacción del animal a dichos estímulos. Esta cuestión cobra una relevancia capital, pues acabará redundando en una irrefutable fiabilidad y por tanto una mayor calidad de los datos emanados del proyecto científico. Es conveniente recordar siempre que los animales estresados a menudo desarrollan comportamientos repetitivos anormales, los cuales reflejan anormalidades subyacentes de la función cerebral y se correlacionan con una amplia gama de cambios de comportamiento. Esto va a afectar seriamente a los resultados experimentales, viéndose afectados tanto la validez como la fiabilidad de los datos, así como la reproducibilidad de los resultados entre los laboratorios.

De las 3Rs existentes, el refinamiento desarrollado para mitigar el sufrimiento y mejorar el bienestar del animal implicado es probablemente el más fácil de lograr a corto plazo para todo tipo de uso de los animales. Tal como recoge el NCBI (*Nuffield Council on Bioethics*), cuya sede se encuentra en Londres, "es atractivo, e indudablemente importante, enfocar un gran esfuerzo en el desarrollo de métodos de reemplazo. Sin embargo, es importante que se reconozca que las expectativas sobre el alcance del reemplazo con métodos que no sean animales no han de ser irreales y que centrarse en el reemplazo no haga perder el horizonte de un buen refinamiento. No se debe subestimar el potencial de mejora a través del refinamiento, mejorando la vida de los animales mediante una mejor cría, mejores técnicas de investigación y mejores métodos veterinarios para aliviar el malestar y el estrés. Sin embargo, para lograr el máximo efecto, es esencial tener en cuenta el tipo de refinamientos disponible y la mejor forma de implementarlo. Dado que el refinamiento se refiere a la reducción del sufrimiento, un requisito previo crucial es, como ya se ha indicado, poder reconocer qué causa, o es probable que cause, que los animales sufran. Y es que hay muchas fuentes de sufrimiento potencial a lo largo de la vida de cada animal que pueden necesitar ser consideradas, además de las que resultan directamente de los procedimientos científicos y sus efectos" (NCBI, 2005).

Sin embargo, no son pocas las complicaciones para implantar el refinamiento correctamente. Aun así, por el momento la implementación de esta opción suele ser más sencilla que la de la reducción y el reemplazo, y además muchas labores de refinamiento han sido desarrolladas por científicos de forma casi "espontánea" durante el curso normal de su trabajo. De hecho, debería haber menos barreras científicas para el refinamiento. Sin embargo, una preocupación común es por ejemplo que la provisión de refinamiento en forma de enriquecimiento ambiental puede agregar variables no deseadas que pueden reducir la validez de algunos de los datos experimentales. Por ejemplo, en Toxicología podría argumentarse que dar elementos masticables de madera a los animales que necesitan esta actividad puede de alguna forma afectar su metabolismo e interferir con los resultados. Esto puede significar que se deban usar más animales para generar resultados estadísticamente significativos, actuando en contra de alguna de las 3Rs. Sin embargo, generalmente hay formas de evitar estos problemas, por ejemplo, mediante el uso de enriquecimientos comercialmente disponibles que se han caracterizado y estandarizado por completo, y que no poseen efectos negativos constatados. Es un campo, por tanto, donde mucho se ha hecho ya... pero donde queda todavía mucho por hacer.

8

Hacia una investigación más...¿sencilla?

Teniendo en cuenta las opciones y consideraciones expuestas hasta este punto, y aplicando, por tanto, como investigadores, correctamente el principio de las 3Rs, el buen diseño de un experimento deberá ayudar a quien lo tiene que realizar a poder:

- Mejorar la calidad de la ciencia que desarrolla en general.
- Ver publicados los resultados obtenidos en revistas de un mayor impacto.
- Ahorrar tiempo y dinero en la experimentación desarrollada.
- Usar un menor número de animales, con las implicaciones que ello conlleva.

24

Sin embargo, como se puede sospechar, tener en cuenta todos los supuestos recogidos en las 3Rs aumenta claramente la complejidad de la experimentación. Se considera de hecho que esta mayor complejidad derivada de la implantación del principio de las 3Rs se parece a la que se introdujo en la sanidad humana con la aparición y estricta aplicación de los protocolos de antisepsia y asepsia en los hospitales: se complica exponencialmente el método de trabajo, aunque los resultados esperados sean netamente mejores. Si bien justamente esta mejora sucede indudablemente desde el punto de vista ético; también desde el punto de vista del resultado de la investigación se generan mejoras sustanciales: como se ha visto, la optimización (por reducción, refinamiento o reemplazo) de la investigación con animales ahorra trabajo y dinero, y ofrece más garantías de resultados correctos (Roi y Grune, 2011).

El bienestar animal es tema de interés tanto del personal científico como del público en general y, fruto de ello, la aplicación de los principios de las 3Rs conlleva diversas implicaciones:

Éticas: ha quedado claro que el uso de animales de laboratorio en la investigación biomédica es un tema controvertido. En una encuesta británica de 1999 se mostró que una parte mayoritaria de los individuos entrevistados se mostraba en desacuerdo con el uso de los animales cuando no se proporcionaban detalles del propósito de la investigación. Sin embargo, la mayoría de la gente aceptaba esta experimentación cuando se indicaba que era para buscar soluciones a problemas médicos de gran relevancia, como el desarrollo de fármacos citostáticos en caso de cáncer infantil. Sin embargo, la mayoría de las personas no estaba de acuerdo con el uso de animales cuando los fines eran "triviales", como las pruebas de los productos cosméticos. Esto replantea una cuestión ya tratada: es necesario comunicar con el público, saber transmitir los beneficios que tanto la investigación básica como la aplicada aportan a la sociedad y/o al medio que nos rodea.

Económicas: el realizar estudios con animales de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) requiere el uso de animales específicos, personal cualificado, instalaciones con condiciones estandarizadas ambientales, sistemas de barrera, filtrado de aire, etc. Por lo tanto, los gastos se disparan en más de un 40%, algo que a los científicos les afecta y muy seriamente. Las 3Rs tienen, en este aspecto, mucho que decir.

Científicas: los experimentos con animales se enfrentan a una serie de deficiencias, tales como la dificultad de estandarización o de normalización, y la gran influencia de los factores externos. Y seguramente, como se ha indicado ya, la mayor limitación de los resultados obtenidos en un experimento con animales es que estos son difíciles de extrapolar: hay que tener en consideración las diferencias inter- e intra-específicas, además de considerar los factores de corrección a aplicar entre grupos taxonómicos y niveles de la cadena trófica.

Todos estos factores (positivos unos, negativos otros) afectan y modulan la investigación y, obviamente, el desarrollo de las líneas futuras en que las 3Rs pueden y deben aplicarse (Pérez-López y González Mateos, 2015). Y es labor del investigador responsable conocer, evaluar y gestionar todos estos factores para en definitiva generar una ciencia al servicio de la sociedad y del mundo.

9 Unas consideraciones finales

En este apartado final, conviene introducir para empezar un nuevo punto, el del posible “conflicto”, desde el punto de vista de una discusión constructiva, que se pueda generar entre las 3Rs, que hasta ahora han sido vistas casi exclusivamente de forma individual. Justamente, el principio de las 3Rs casi siempre se considera como una unidad, pero en la práctica pueden existir conflictos entre sus tres componentes (como de hecho los hay). A veces el conflicto se establece solamente entre dos de las 3Rs. ¿Reducir o refinar, por ejemplo? Algunos procedimientos se pueden realizar de tal manera que inflijan menos daño a un número mayor de animales, o bien infligiendo más daño, pero a un menor número de animales. Los ejemplos son sencillos de encontrar: es el caso de la reutilización de animales en diferentes experimentos *versus* el uso de animales ingenuos (término empleado para referirse a especímenes no utilizados en investigación nunca, con anterioridad) para cada experimento; o por ejemplo coger muestras de sangre (y en mayor cantidad) de menos animales en comparación con una cantidad menor de sangre, pero de un número mayor de animales (Olsson et al., 2012).

Un punto y aparte se merece la siguiente reflexión (relacionada con el ejemplo anterior), partiendo de que el objetivo de la reducción se deriva del argumento de “maldad del acto de matar”, es decir, uno debe, en la medida de lo posible, evitar quitar la vida de los animales (Hansen et al., 1999). Sin embargo, para otros usos de los animales, incluida la producción de alimentos, este argumento parece obtener poco apoyo público. Esto es lo que se pretende ilustrar con un ejemplo muy aclaratorio tomado de un manual de los colegas de la “*3R Research Foundation*” de Suiza: en un experimento de Toxicología se requieren diez ratas, de las que se sospecha que claramente van a sufrir dolor por el diseño considerado y el agente empleado para ensayar. Un segundo diseño de investigación posible para esos mismos objetivos requiere del doble de animales (20 ratas), pero en este segundo ensayo sin embargo las ratas sufrirán muy poco o ningún dolor. ¿Qué diseño debería elegir el científico comprometido con las 3Rs? Esta es una decisión que tiene que hacerse siempre sobre una base específica para cada caso, obviamente. No obstante, en principio, los expertos seguramente coincidan en que la segunda variante será la mejor opción. La reducción del dolor del animal individual será más importante que la reducción del número de animales empleados en la investigación. Una R, sin pretenderlo, se ha impuesto sutilmente a la otra. El debate está servido.

Otro aspecto a considerar también es la inevitable evolución de los conceptos aquí tratados, que claramente no han permanecido imperturbables durante los últimos años. En comparación con las definiciones originales de Russell y Burch, se han realizado varios intentos para redefinir los términos reemplazo, reducción y refinamiento. Es el caso del trabajo de Tannenbaum y Bennett (2015), que revisaron estos conceptos y concluyeron que las definiciones originales tienen mucho que aportar todavía. Sin embargo, las definiciones por sí solas no reconocen los avances notables en la tecnología que han permitido a los científicos abordar las necesidades de su población objetivo (generalmente los seres humanos) de una forma que no era posible hace unos pocos años. La tabla 2, por lo tanto, propone un enfoque contemporáneo que ha sido desarrollado por el Centro Nacional de las 3Rs británico (NC3R a partir de su forma inglesa) para actualizar los conceptos de reemplazo/reducción/refinamiento.

	Definición convencional	Aproximación actual
Reemplazo	Sustitución de animales vivos conscientes por material inconsciente	Acelerar el desarrollo y el uso de herramientas relevantes para la especie objetivo (generalmente humanos) basado en las últimas tecnologías
Reducción	Reducción en el número de animales utilizados para obtener información precisa y correcta	Usar experimentos con animales diseñados y considerados apropiadamente, que sean robustos y reproducibles
Refinamiento	Disminución en la incidencia o severidad de los procedimientos inhumanos aplicados a aquellos animales que aún deben ser utilizados	Emplear nuevas tecnologías in vivo que pueden beneficiar el bienestar animal y la ciencia, incluidos los métodos para minimizar el dolor y la angustia, así como para proporcionar mejoras en el cuidado, el manejo, la capacitación y el uso de los animales

Tabla 2. Comparación de las definiciones convencionales de las 3Rs propuestas por Russell y Burch con los enfoques contemporáneos para avanzar en el progreso científico (datos del NC3R, adaptado de McArthur Clark, 2017).

Los tres conceptos que se han presentado se muestran por tanto totalmente dinámicos, lo que hace que el enfoque llegue a ser más atractivo para los científicos, siempre en su deseo de que la aplicación y mejora de los conceptos asociados a las 3Rs sea más una forma de beneficiar a la ciencia y a la humanidad que una traba que cree obstáculos desalentadores.

Como ya se ha señalado con anterioridad, promover las 3Rs en la investigación no solo brinda beneficios éticos asociados con evitar el uso de animales y lograr un mayor bienestar en aquellos que se tengan que usar, sino que también tiene un gran potencial para brindar beneficios científicos (algo en lo que casi todos los científicos coinciden). Se requiere un equilibrio entre las necesidades de la ciencia y las necesidades de los animales y es este equilibrio el que ha de ayudar a sostener la “frágil” confianza del público en los procesos de revisión ética y la supervisión reguladora del uso de animales en la ciencia para los más variados fines (docencia, investigación,...). Esto es complicado, sin duda alguna, y el mover la balanza hacia un lado u otro (tomar partido excesivo por la autoridad de la ciencia, o dejarse llevar demasiado por el a veces excesivo y humanizado concepto de bienestar animal) hará que todos perdamos en el proceso, y lo que es peor, los científicos deberemos enfrentarnos a una sociedad que nos mirará con recelo e incluso con franca enemistad, socavando las bases de una ciencia libre, ética y correcta, básica para el siglo XXI que estamos ya construyendo entre todos.

Si bien ya se va alejando estrictamente del campo de las 3Rs, pero al estar íntimamente relacionado, conviene hacer aquí una mención muy especial a la red que en España se está encargando de recopilar y difundir los métodos alternativos a la experimentación que se van desarrollando paulatinamente. Así desde 2005, en internet es posible consultar “Buscaalternativas.com”, un sitio en español sobre alternativas a la experimentación animal (<http://buscaalternativas.com>), que se mantiene perfectamente actualizado en todos sus contenidos.

Y de suma importancia es también REMA, la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal (<http://www.remanet.net>), oficialmente constituida en 1999 como un foro de discusión para lograr un menor y más racional uso de los animales de experimentación. La red se encarga también de fomentar el desarrollo, la validación y la utilización de los métodos *in vitro*, con el fin de conseguir una mejor y más eficaz aplicación de los principios de reemplazo, reducción y refinamiento del uso de animales en la experimentación. De esta forma, REMA integra y coordina sabiamente las iniciativas de la industria, la administración y la sociedad con las del mundo científico respecto al estudio, la validación, la aplicación y la implementación legal del uso de métodos alternativos, así como también impulsa la divulgación de la problemática y los avances alcanzados en este campo (de la Peña, 2014).



Figura 6.- Pantalla principal de la página web de buscaalternativas.com

Para acabar, es interesante considerar que, a pesar de que existen muchos métodos alternativos para reemplazar a los animales, el uso de animales en la investigación biomédica sigue siendo prácticamente inevitable si deseamos una ciencia de alta calidad. Pero el público (y los investigadores, claro está) espera que se apliquen altos estándares de cuidado y uso a los animales de investigación. Por ello, los requisitos legales obligan a los científicos que llevan a cabo investigaciones basadas en animales a garantizar que sus experimentos se lleven a cabo de forma humana, a fin de satisfacer las preocupaciones de la sociedad y garantizar la calidad de sus resultados experimentales. Estos requisitos definen claramente la obligación moral del equipo de investigación de justificar éticamente la experimentación animal al panel de revisión ética de su institución y al conjunto de la comunidad. La justificación ética de los protocolos de investigación en animales de laboratorio refleja el interés y la responsabilidad de los científicos de reducir el número de animales, refinar los procedimientos y posiblemente reemplazar a los animales en sus proyectos de investigación. Este proceso construirá una relación de confianza entre los científicos y la sociedad, algo que consideramos de gran importancia. Y precisamente también es muy importante educar a la próxima generación de científicos y legisladores para que piensen tanto en ética como en ciencia (Kostomitsopoulos y Đurašević, 2010). En gran parte, la generación actual de reguladores se educó hace unos 20-30 años, cuando el credo todavía era "*in vivo veritas*". Esta educación sigue siendo muy influyente en el nivel en que los interesados se sienten cómodos con ciertos modelos tradicionales, de tal forma que, para ganar confianza en las nuevas técnicas, es importante poder trabajar con ellas y adquirir experiencia con la forma en que funcionan. La educación y la capacitación son, por lo tanto, aspectos de enorme relevancia en la

aceptación y el uso de los modelos 3Rs, consiguiendo experiencias positivas que convengan de verdad (Schiffelers et al., 2012).

Y en todo este largo proceso, la ética, sin lugar a dudas, debe ir de la mano de una ciencia de calidad para mejorar aún más, en todos los aspectos, la investigación que emplea animales en su quehacer diario.

10 Referencias

- Aguilar Catalán, A., Coyo Asensio, N. & Giménez Terré, A. (2012). Bioética en Experimentación Animal. Facultad de Veterinaria (UAB), Barcelona.
- Arluke A, Sanders CR. (1996). Regarding Animals. Temple University Press, Philadelphia, USA.
- Aranda, A. & Pastor, LM. (2009). Ética de la experimentación con animales. *Revista Bioética y Ciencias de la Salud* 3(4): 1-11.
- Aske, K.C. & Waugh, C.A. (2017). Expanding the 3R principles. More rigour and transparency in research using animals. *EMBO Reports* 18(9): 1490-1492.
- Bijlsma, S., Bobeldijk, I., Verheij, E.R., Ramaker, R., Kochhar, S., Macdonald, I.A., van Ommen, B. & Smilde, A.K. (2005). Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation. *Analytical Chemistry* 78: 567-574.
- Cuesta, L. & Sánchez, K. (2007). Aspectos éticos de la experimentación con animales. *Bioética* mayo-agosto: 25-27.
- de la Peña, E. (2014). Actividades de promoción y difusión de alternativas en España. *Revista de Toxicología* 31: 115-120.
- Fosse, R.T. (2010). Opening lecture. EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Science) Annual Conference, Brussels, Belgium, 30 November 2010. http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/3_events/ann_conf_2010/04_fosse.pdf.
- Gouveia, K. & Hurst, J.L. (2013). Reducing mouse anxiety during handling: effect of experience with handling tunnels. *PLOS ONE* 8: e66401.
- Hansen, A.K., Sandøe, P., Svendsen, O., Forsman, B. & Thomsen, P. (1999). The need to refine the notion of reduction. En: Hendriksen, C. & Morton, D. (Eds.). *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Ed. RSM Press, London: pp. 139-144.
- Hartung, T. (2010). Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC - a t4 report. *Altex* 27: 285-303.
- Holley, T., Bowe, G., Campia, I., Belz, S., Berggren, E., Janusch-Roi, A., Wittwehr, C. & Whelan, M. (2016). Accelerating progress in the Replacement, Reduction and Refinement of animal testing through better knowledge sharing. *JCR Science for Policy Report*.
- Ibrahim, D.M. (2006). Reduce, Refine, Replace: The failure of the Three R's and the future of animal experimentation. Faculty Publications. Paper 1691.
- Kilkenny, C., Parsons, N., Kadoszewski, E., Festing, M.F.W., Cuthill, I.C., Fry, D., Hutton, J. & Altman, D.G. (2009). Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS ONE* 4: e7824.
- Kim, H. & Ingber, D.E. (2013). Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences From Nano to Macro* 5: 1130-1140.
- Kostomitsopoulos, N.G. & Đurašević, S.F. (2010). The ethical justification for the use of animals in biomedical research. *Archives of Biological Sciences* 62(3): 781-787.
-

- León, P. & Dignoes, O. (2014). Los métodos alternativos: un reto para las administraciones y para los científicos. *Revista de Toxicología* 31: 105-107.
- Liebsch, M., Grune, B., Seiler, A., Butzke, D., Oelgeschläger, M., Pirow, R., Adler, S., Riebeling, C. & Luch, A. (2011). Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Archives of Toxicology* 85: 841-858.
- MacArthur Clark, J. (2015) Legal and ethical aspects of using animals in research in the EU (video file). En: The Biomedical & Life Sciences Collection, Henry Stewart Talks. <https://hstalks.com/bs/3173/>
- MacArthur Clark, J. (2017). The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition* 1-7.
- Madden, J.C., Hewitt, M., Przybylak, K., Vandebriel, R.J., Piersma, A.H. & Cronin, M.T.D. (2012). Strategies for the optimisation of in vivo experiments in accordance with the 3Rs philosophy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63(1): 140-154.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2016). Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia en 2016, pp 1-20.
- Marcos, A. (2014). La experimentación con animales: perspectivas filosóficas. *Revista Lasallista de Investigación* 11(1): 11-22.
- Míguez, M.P., Largo Bermejo, J.D., Pérez-López, M. (2016). Perspectivas de la Experimentación Animal en Ciencias Biomédicas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura, Cáceres.
- NCBI (Nuffield Council on Bioethics). (2005). *The Ethics of Research Involving Animals*. Ed NCBI, London.
- OCDE. (1992). Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
- Olsson, I.A., Franco, N.H., Weary, D.M. & Sandøe, P. (2012). The 3Rs Principle - Mind the Ethical Gap!. *Altex Proceedings* 1/12, Proceedings of WC8.
- Omoe, H. (2006). Recent Trends in animal experimentation in Japan. -on the revision and implementation of the law for the humane treatment and management of animals. *Quarterly Review* 21: 13-31.
- Pardo, A. (2005). Ética de la experimentación animal. Directrices legales y éticas contemporáneas. *Cuadernos de Bioética* XVI: 393-417.
- Pérez-López, M. & González Mateos, A. (2015). El principio de las tres erres: reemplazo, reducción y refinamiento. En: González Mateos, A., Pérez-López, M. (Eds.). *Manual Básico para Usuarios de Animales en la Experimentación en Ciencias Biomédicas*. Librería Técnica Universitaria Figueroa, Cáceres: pp. 25-40.
- Navarro Hernández, J.A., Ramírez Ojeda, R.A. & Villagrán Vélez, C. (2012). *Manual de Procedimientos Recomendables para la Investigación con Animales*. Ed. Samsara, México.
- Roi, A.J. & Grune, B. (2011). *The ECVAM Search Guide- Good Search Practice on Animal Alternatives*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Romero-Figueroa, B.P., Gutiérrez-Figueroa, M.F. & Figueroa-García, M.C. (2017). La ética y el uso de animales en la experimentación. *Revista del Hospital Juárez de México* 84(2): 60-62.
- Russell, W.M.S. & Burch, R.L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Ed. Methuen, London.
- Schiffelers, M.J.W.A., Blaauboer, B.J., Hendriksen, C.F.M. & Bakker, W.E. (2012). Regulatory Acceptance and Use of 3R Models: a multilevel perspective. *Altex* 29: 287-300.
- Tannenbaum, J. & Bennett, B.T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 54: 120-132.
- Unión Europea (2010). Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.



Casos Prácticos

1. Supuesto de discusión ética.

Muchos de los colectivos que se oponen al uso de animales en investigación asumen que no necesitan justificar moralmente su posición, puesto que no son ellos los que infringen el “daño” a los animales. Pero ¿es esto así? Si entre todos se decidiera paralizar completamente el uso de animales en experimentación, ¿considera que habría algún “daño” generado, que debería ser asumido por quien ha decidido prohibir el uso total de los animales para la investigación? Razone detalladamente su respuesta, pues le ayudará a enfrentarse con un dilema evidente.

30

2. En la página de buscaalternativas.com, es posible acceder a la sección de Diseño experimental, aspecto que un investigador debe dominar para poder desarrollar su labor correctamente. Dentro de él, el primer subapartado habla sobre la Reducción dentro de las 3R. Entre en ese capítulo, e intente localizar cómo se desarrolla un estudio piloto, en qué consiste.

3. Si un investigador decide emplear cultivos celulares de gónada de pez en lugar de realizar un estudio exponiendo a distintos peces a contaminantes ambientales, ¿cuál de las 3Rs está desarrollando?

4. Si debe desarrollar un estudio con organismos acuáticos, siguiendo el principio de las 3Rs, en igualdad de condiciones ¿debería realizarlo con peces, con microcrustáceos o con aves acuáticas? Razone la respuesta

5. Para llevar a cabo una investigación sobre agentes tumorales puede emplear un procedimiento que usa 6 ratones que serán sometidos a una manipulación aceptada por su comité de bioética. Sin embargo, existe otra metodología que permite emplear tan solo 2 animales, pero sometidos a mayor grado de ansiedad, aunque también aceptado por su comité de bioética. ¿Cuál de los dos procedimientos emplearía?

Preguntas

1. Según la filosofía cartesiana de Descartes
 - a) animales y seres humanos comparten alma.
 - b) solo los humanos tienen mente, alma y conciencia.
 - c) solo los animales tienen mente, alma y conciencia.
 - d) Alma y conciencia son invenciones humanas, ausentes de los seres vivos.

 2. Andreas Vesalius fue famoso por
 - a) desarrollar el estudio sobre la estructura del sistema nervioso central en primates.
 - b) poner de manifiesto la circulación de la sangre.
 - c) conducir varios experimentos en monos, cerdos y cabras, de los cuales hizo dibujos anatómicos muy precisos.
 - d) usar cerdos vivos para investigar las funciones de varios nervios y también demostrar la posición de los uréteres.

 3. El reemplazo
 - a) fue la primera de las 3Rs en ser postulada por Russell y Burch.
 - b) es el único objetivo que es totalmente compatible con la perspectiva del mantenimiento de los derechos de los animales usados en experimentación.
 - c) es probablemente la más fácil de las 3Rs para comunicarse al gran público.
 - d) todas las respuestas son verdaderas.

 4. Entre las medidas de reemplazo:
 - a) el uso de cultivos celulares para sustituir a estudios en organismos superiores.
 - b) el uso de estudios en vertebrados superiores para sustituir a estudios desarrollados con células o tejidos.
 - c) los ensayos computacionales no pueden ser considerados de reemplazo pues siguen necesitando estudios con animales accesorios.
 - d) todas las respuestas anteriores son falsas.

 5. Rellene la frase siguiente con la palabra que falta:
En la reducción, la tarea principal y más complicada es determinar el número de animales por grupo en un ensayo dado.

 6. En el refinamiento
 - a) se pretende minimizar el sufrimiento del animal, despreocupándose de la posible ansiedad.
 - b) considera que el bienestar del animal no influye en el resultado obtenido en el experimento.
 - c) desarrolla de toda una batería de nuevos métodos que ofrecen mejoras en el cuidado, la manipulación y el uso de los animales.
 - d) evalúa el efecto de molestias innecesarias, para así incorporarlas al protocolo experimental.

 7. El refinamiento
 - a) propone emplear animales nacidos libres, para que se pueda medir la respuesta al mantenimiento en cautividad.
-

- b) en igualdad de condiciones escoge animales situados lo más alto posible en la escala filogenética, para poder cerciorarse de una buena medida del dolor o la ansiedad.
- c) lleva a cabo procedimientos de estabulación adecuados a cada especie animal, que permitan un comportamiento lo más natural posible.
- d) está en contra del enriquecimiento ambiental, pues obstaculiza los objetivos de la experimentación.

8. La aplicación de los principios de las 3Rs a la investigación

- a) va a dificultar la publicación de los resultados en revistas de alto índice de impacto.
- b) ahorra tiempo y dinero en la experimentación desarrollada.
- c) no ayuda a mejorar la calidad de la ciencia en general.
- d) todas las respuestas anteriores son falsas.

9. Entre las medidas posibles para aplicar el principio de reducción

- a) se considera la realización de estudios piloto
- b) se considera el compartir animales entre varias experiencias
- c) se considera el aplicar correctos autocontroles
- d) todas las respuestas son verdaderas

10. El grupo animal más empleado en experimentación en España es el de los, seguido ya a distancia por el de las

Recursos Rurais

Revista do Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvemento Rural (IBADER)

Proceso de selección e avaliación de orixinais

Recursos Rurais publica artigos, revisións, notas de investigación e reseñas bibliográficas. Os artigos, revisións e notas deben ser orixinais, sendo avaliados previamente polo Comité Editorial e o Comité Científico Asesor. Os traballos presentados a Recursos Rurais serán sometidos á avaliación confidencial de dous expertos alleos ao equipo editorial, seguindo criterios internacionais. Caso dos avaliadores propoñeren modificacións na redacción do orixinal, será de responsabilidade do equipo editorial -unha vez informado o autor- o seguimento do proceso de reelaboración do traballo. Caso de non ser aceptado para a súa edición, o orixinal será devolto ao seu autor, xunto cos ditames emitidos polos avaliadores. En calquera caso, os orixinais que non se suxeiten ás seguintes normas técnicas serán devoltos aos seus autores para a súa corrección, antes do seu envío aos avaliadores.

Normas para a presentación de orixinais

Procedemento editorial

A Revista Recursos Rurais aceptará para a súa revisión artigos, revisións e notas vinculados á investigación e desenvolvemento tecnolóxico no ámbito da conservación e xestión da biodiversidade e do medio ambiente, dos sistemas de produción agrícola, gandeira, forestal e referidos á planificación do territorio, tendentes a propiciar o desenvolvemento sostible dos recursos naturais do espazo rural. Os artigos que non se axusten ás normas da revista, serán devoltos aos seus autores.

Preparación do manuscrito

Comentarios xerais

Os manuscritos non deben exceder de 20 páxinas impresas en tamaño A4, incluíndo figuras, táboas, ilustracións e a lista de referencias. Todas as páxinas deberán ir numeradas, aínda que no texto non se incluírán referencias ao número de páxina. Os artigos poden presentarse nos seguintes idiomas: galego, castelán, portugués, francés ou inglés. Os orixinais deben prepararse nun procesador compatible con Microsoft Word®, a dobre espazo nunha cara e con 2,5 cm de marxe. Empregarase a fonte tipográfica "arial" a tamaño 11 e non se incluírán tabulacións nin sangrías, tanto no texto como na lista de referencias bibliográficas. Os parágrafos non deben ir separados por espazos. Non se admitiran notas ao pé.

Os nomes de xéneros e especies deben escribirse en cursiva e non abreviados a primeira vez que se mencionen. Posteriormente o epíteto xenérico poderá abreviarse a unha soa letra. Debe utilizarse o Sistema Internacional (SI) de unidades. Para o uso correcto dos símbolos e observacións máis comúns pode consultarse a última edición do CBE (Council of Biology Editors) Style manual.

Páxina de Título

A páxina de título incluírá un título conciso e informativo (na lingua orixinal e en inglés), o nome(s) do autor(es), a afiliación(s) e a dirección(s) do autor(es), así como a dirección de correo electrónico, número de teléfono e de fax do autor co que se manterá a comunicación.

Resumo

Cada artigo debe estar precedido por un resumo que presente os principais resultados e as conclusións máis importantes, cunha extensión máxima de 200 palabras. Ademais do idioma orixinal no que se escriba o artigo, presentárase tamén un resumo en inglés.

Palabras clave

Deben incluírse ata 5 palabras clave situadas despois de cada resumo distintas das incluídas no título.

Organización do texto

A estrutura do artigo debe axustarse na medida do posible á seguinte distribución de apartados: Introducción, Material e métodos, Resultados e discusión, Agradecementos e Bibliografía. Os apartados irán resaltados en negraíña e tamaño de letra 12. Se se necesita a inclusión de subapartados estes non estarán numerados e tipografíaranse en tamaño de letra 11.

Introdución

A introdución debe indicar o propósito da investigación e prover unha revisión curta da literatura pertinente.

Material e métodos

Este apartado debe ser breve, pero proporcionar suficiente

información como para poder reproducir o traballo experimental ou entender a metodoloxía empregada no traballo.

Resultados e Discusión

Neste apartado expóranse os resultados obtidos. Os datos deben presentarse tan claros e concisos como sexa posible, se é apropiado na forma de táboas ou de figuras, aínda que as táboas moi grandes deben evitarse. Os datos non deben repetirse en táboas e figuras. A discusión debe consistir na interpretación dos resultados e da súa significación en relación ao traballo doutros autores. Pode incluírse unha conclusión curta, no caso de que os resultados e a discusión o propicien.

Agradecementos

Deben ser tan breves como sexa posible. Calquera concesión que requira o agradecemento debe ser mencionada. Os nomes de organizacións financiadoras deben escribirse de forma completa.

Bibliografía

A lista de referencias debe incluír unicamente os traballos que se citan no texto e que se publicaron ou que foron aceptados para a súa publicación. As comunicacións persoais deben mencionarse soamente no texto. No texto, as referencias deben citarse polo autor e o ano e enumerar en orde alfabética na lista de referencias bibliográficas.

Exemplos de citación no texto:

Descricións similares danse noutros traballos (Fernández 2005a, b; Rodrigo et al. 1992).

Andrade (1949) indica como....

Segundo Mario & Tinetti (1989) os factores principais están....

Moore et al. (1991) suxíren iso....

Exemplos de lista de referencias bibliográficas:

Artigo de revista:

Mahaney, W.M.M., Wardrop, D.H. & Brooks, P. (2005). Impacts of sedimentation and nitrogen enrichment on wetland plant community development. *Plant Ecology*. 175, 2: 227-243.

Capítulo nun libro:

Campbell, J.G. (1981). The use of Landsat MSS data for ecological mapping. En: Campbell J.G. (Ed.) *Matching Remote Sensing Technologies and Their Applications*. Remote Sensing Society, London.

Lowel, E.M. & Nelson, J. (2003). Structure and morphology of Grasses. En: R.F. Barnes et al. (Eds.). *Forages. An introduction to grassland agriculture*. Iowa State University Press. Vol. 1. 25-50

Libro completo:

Jensen, W (1996). *Remote Sensing of the Environment: An Earth Resource Perspective*. Prentice-Hall, Inc. Saddle River, New Jersey.

Unha serie estándar:

Tutin, T.G. et al. (1964-80). *Flora Europaea*, Vol. 1 (1964); Vol. 2 (1968); Vol. 3 (1972); Vol. 4 (1976); Vol. 5 (1980). Cambridge University Press, Cambridge.

Obra institucional:

MAPYA (2000). *Anuario de estadística agraria*. Servicio de Publicaciones del MAPYA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), Madrid, España.

Documentos legais:

BOE (2004). Real Decreto 1310/2004, de 15 de enero, que modifica la Ley de aprovechamiento de residuos ganaderos. BOE (Boletín Oficial del Estado), nº 8, 15/1/04. Madrid, España.

Publicacións electrónicas:

Collins, D.C. (2005). *Scientific style and format*. Disponível en: <http://www.councilscience.org/publications.cfm> [5 xaneiro, 2005]

Os artigos que fosen aceptados para a súa publicación incluíranse na lista de referencias bibliográficas co nome da revista e o epíteto "en prensa" en lugar do ano de publicación.

Ilustracións e táboas

Todas as figuras (fotografías, gráficos ou diagramas) e as táboas deben citarse no texto, e cada unha deberá ir numerada consecutivamente. As figuras e táboas deben incluírse ao final do artigo, cada unha nunha folla separada na que se indicará o número de táboa ou figura, para a súa identificación. Para o envío de figuras en forma electrónica vexa máis adiante. Debuxos lineais. Por favor envíe impresións de boa calidade. As inscricións deben ser claramente lexíbeis. O mínimo grosor de liña será de 0,2 mm en relación co tamaño final. No caso de Ilustracións en tons medios (escala de grises): Envíe por favor as impresións ben contrastadas. A ampliación débese indicar por barras de escala. Acéptanse figuras en cores.

Tamaño das figuras

As figuras deben axustarse á anchura da columna (8.5 centímetros) ou ter 17.5 centímetros de ancho. A lonxitude

máxima é 23 centímetros. Deseñe as súas ilustracións pensando no tamaño final, procurando non deixar grandes espazos en branco. Todas as táboas e figuras deberán ir acompañadas dunha lenda. As lendas deben consistir en explicacións breves, suficientes para a comprensión das ilustracións por si mesmas. Nas mesmas incluírase unha explicación de cada unha das abreviaturas incluídas na figura ou táboa. As lendas débense incluír ao final do texto, tras as referencias bibliográficas e deben estar identificadas (ex: Táboa 1 Características...). Os mapas incluírán sempre o Norte, a latitude e a lonxitude.

Preparación do manuscrito para o seu envío

Texto

Grave o seu arquivo de texto nun formato compatible con Microsoft Word.

Táboas e Figuras

Cada táboa e figura gardarase nun arquivo distinto co número da táboa e/ou figura. Os formatos preferidos para os gráficos son: Para os vectores, formato EPS, exportados desde o programa de debuxo empregado (en todo caso, incluírán unha cabeceira da figura en formato TIFF) e para as ilustracións en tons de grises ou fotografías, formato TIFF, sen comprimir cunha resolución mínima de 300 ppp. En caso de enviar os gráficos nos seus arquivos orixinais (Excel, Corel Draw, Adobe Illustrator, etc.) estes acompañaríanse das fontes utilizadas. O nome do arquivo da figura (un arquivo diferente por cada figura) incluírá o número da ilustración. En ningún caso se incluírá no arquivo da táboa ou figura a lenda, que debe figurar correctamente identificada ao final do texto. O material gráfico escaneado deberá aterse aos seguintes parámetros: Debuxos de liñas: o escaneado realizarase en liña ou mapa de bits (nunca escala de grises) cunha resolución mínima de 800 ppp e recomendada de entre 1200 e 1600 ppp. Figuras de medios tons e fotografías: escanearanse en escala de grises cunha resolución mínima de 300 ppp e recomendada entre 600 e 1200 ppp.

Recepción do manuscrito

Os autores enviarán un orixinal e dúas copias do artigo completo ao comité editorial, xunto cunha copia dixital, acompañados dunha carta de presentación na que ademais dos datos do autor, figuren a súa dirección de correo electrónico e o seu número de fax, á seguinte dirección:

IBADER

Comité Editorial da revista Recursos Rurais
Universidade de Santiago
Campus Universitario s/n
E-27002 LUGO - Spain

Enviar o texto e cada unha das ilustracións en arquivos diferentes, nalgún dos seguintes soportes: CD-ROM ou DVD para Windows, que irán convenientemente rotulados indicando o seu contido. Os nomes dos arquivos non superarán os 8 caracteres e non incluírán acentos ou caracteres especiais. O arquivo de texto denominárase polo nome do autor.

Ou ben enviar unha copia dixital dos arquivos convintemente preparados á dirección de e-mail:
ibader@usc.es

Cos arquivos inclúase sempre información sobre o sistema operativo, o procesador de texto, así como sobre os programas de debuxo empregados nas figuras.

Copyright: Unha vez aceptado o artigo para a publicación na revista, o autor(es) debe asinar o copyright correspondente.

Decembro 2015

Recursos Rurais

Revista do Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvimento Rural (IBADER)

Proceso de selección y evaluación de originales

Recursos Rurais publica artículos, revisiones, notas de investigación y reseñas bibliográficas. Los artículos, revisiones y notas deben ser originales, siendo evaluados previamente por el Comité Editorial y el Comité Científico Asesor. Los trabajos presentados a Recursos Rurais serán sometidos a la evaluación confidencial de dos expertos ajenos al equipo editorial, siguiendo criterios internacionales. En el caso de que los evaluadores propongan modificaciones en la redacción del original, será responsabilidad del equipo editorial -una vez informado el autor- el seguimiento del proceso de reelaboración del trabajo. Caso de no ser aceptado para su edición, el original será devuelto a su autor, junto con los dictámenes emitidos por los evaluadores.

En cualquier caso, los originales que no se ajusten a las siguientes normas técnicas serán devueltos a sus autores para su corrección, antes de su envío a los evaluadores.

Normas para la presentación de originales

procedimiento editorial

La Revista Recursos Rurais aceptará para a su revisión artículos, revisiones y notas vinculados a la investigación y desenvolvimiento tecnológico en el ámbito de la conservación y gestión de la biodiversidad y del medio ambiente, de los sistemas de producción agrícola, ganadera, forestal y referidos a la planificación del territorio, tendientes a propiciar el desarrollo sostenible de los recursos naturales del espacio rural y de las áreas protegidas. Los artículos que no se ajusten a las normas de la revista, serán devueltos a sus autores.

Preparación del manuscrito

Comentarios generales

Los manuscritos no deben exceder de 20 páginas impresas en tamaño A4, incluyendo figuras, tablas, ilustraciones y la lista de referencias. Todas las páginas deberán ir numeradas, aunque en el texto no se incluirán referencias al número de página. Los artículos pueden presentarse en los siguientes idiomas: galego, castellano, portugués, francés o inglés. Los originales deben prepararse en un procesador compatible con Microsoft Word®, a doble espacio en una cara y con 2,5 cm de margen. Se empleará la fuente tipográfica "arial" a tamaño 11 y no se incluirán tabulaciones ni sangrías, tanto en el texto como en la lista de referencias bibliográficas. Los párrafos no deben ir separados por espacios. No se admitirán notas al pie.

Los nombres de géneros y especies deben escribirse en cursiva y no abreviados la primera vez que se mencionen. Posteriormente el epíteto genérico podrá abreviarse a una sola letra. Debe utilizarse el Sistema Internacional (SI) de unidades. Para el uso correcto de los símbolos y observaciones más comunes puede consultarse la última edición de CBE (Council of Biology Editors) Style manual.

Página de Título

La página de título incluirá un título conciso e informativo (en la lengua original y en inglés), el nombre(s) de los autor(es), la afiliación(s) y la dirección(s) de los autor(es), así como la dirección de correo electrónico, número de teléfono y de fax del autor con que se mantendrá la comunicación.

Resumen

Cada artículo debe estar precedido por un resumen que presente los principales resultados y las conclusiones más importantes, con una extensión máxima de 200 palabras. Además del idioma original en el que se escriba el artículo, se presentará también un resumen en inglés.

Palabras clave

Deben incluirse hasta 5 palabras clave situadas después de cada resumen, distintas de las incluidas en el título.

Organización del texto

La estructura del artículo debe ajustarse a la medida de lo posible a la siguiente distribución de apartados: Introducción, Material y métodos, Resultados y discusión, Agradecimientos y Bibliografía. Los apartados irán resaltados en negrita y tamaño de letra 12. Si se necesita la inclusión de subapartados estos no estarán numerados y se tipografiarán en tamaño de letra 11.

Introducción

La introducción debe indicar el propósito de la investigación y

proveer una revisión corta de la literatura pertinente.

Material y métodos

Este apartado debe ser breve, pero proporcionar suficiente información como para poder reproducir el trabajo experimental o entender la metodología empleada en el trabajo.

Resultados y Discusión

En este apartado se expondrán los resultados obtenidos. Los datos deben presentarse tan claros y concisos como sea posible, si es apropiado en forma de tablas o de figuras, aunque las tablas muy grandes deben evitarse. Los datos no deben repetirse en tablas y figuras. La discusión debe consistir en la interpretación de los resultados y de su significación en relación al trabajo de otros autores. Puede incluirse una conclusión corta, en el caso de que los resultados y la discusión lo propicien.

Agradecimientos

Deben ser tan breves como sea posible. Cualquier concesión que requiera el agradecimiento debe ser mencionada. Los nombres de organizaciones financiadoras deben escribirse de forma completa.

Bibliografía

La lista de referencias debe incluir únicamente los trabajos que se citan en el texto y que estén publicados o que hayan sido aceptados para su publicación. Las comunicaciones personales deben mencionarse solamente en el texto. En el texto, las referencias deben citarse por el autor y el año y enumerar en orden alfabético en la lista de referencias bibliográficas.

ejemplos de citación en el texto:

Descripciones similares se dan en otros trabajos (Fernández 2005a, b; Rodrigo et al. 1992).

Andrade (1949) indica como....

según Mario & Tinetti (1989) los factores principales están....

Moore et al. (1991) sugieren eso....

Ejemplos de lista de referencias bibliográficas:

Artículo de revista:

Mahaney, W.M.M., Wardrop, D.H. & Brooks, P. (2005). Impacts of sedimentation and nitrogen enrichment on wetland plant community development. *Plant Ecology*, 175, 2: 227-243.

Capítulo en un libro:

Campbell, J.G. (1981). The use of Landsat MSS data for ecological mapping. En: R.F. Barnes et al. (Eds.) *Matching Remote Sensing Technologies and Their Applications*. Remote Sensing Society, London.

Lowell, E.M. & Nelson, J. (2003). Structure and morphology of Grasses. En: R.F. Barnes et al. (Eds.). *Forrages. An introduction to grassland agriculture*. Iowa State University Press. Vol. 1. 25-50

Libro completo:

Jensen, W (1996). *Remote Sensing of the Environment: An Earth Resource Perspective*. Prentice-Hall, Inc. Saddle River, New Jersey.

Una serie estándar:

Tutin, T.G. et al. (1964-80). *Flora Europaea*, Vol. 1 (1964); Vol. 2 (1968); Vol. 3 (1972); Vol. 4 (1976); Vol. 5 (1980). Cambridge University Press, Cambridge.

Obra institucional:

MAPYA (2000). Anuario de estadística agraria. Servicio de Publicaciones del MAPYA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), Madrid, España.

Documentos legales:

BOE (2004). Real Decreto 1310/2004, de 15 de enero, que modifica la Ley de aprovechamiento de residuos ganaderos. BOE (Boletín Oficial del Estado), nº 8, 15/11/04. Madrid, España.

Publicaciones electrónicas:

Collins, D.C. (2005). Scientific style and format. Disponible en: <http://www.councilscience.org/publications.cfm> [5 xaneiro, 2005]

Los artículos que fuesen aceptados para su publicación se incluirán en la lista de referencias bibliográficas con el nombre de la revista y el epíteto "en prensa" en lugar del año de publicación.

Ilustraciones y tablas

Todas las figuras (fotografías, gráficos o diagramas) y las tablas deben citarse en el texto, y cada una deberá ir numerada consecutivamente. Las figuras y tablas deben incluirse al final del artículo, cada una en una hoja separada en la que se indicará el número de tabla o figura, para su identificación. Para el envío de figuras en forma electrónica vea más adelante. Dibujos lineales. Por favor envíe impresiones de buena calidad. Las inscripciones deben ser claramente legibles. El mínimo grosor de línea será de 0,2 mm en relación con el tamaño final. En el caso de ilustraciones en tonos medios (escala de grises): Envíe por favor las impresiones bien contrastadas. La ampliación se debe indicar mediante barras de escala. Se aceptan figuras en color.

Tamaño de las figuras

Las figuras deben ajustarse a la anchura de la columna (8.5 centímetros) o tener 17.5 centímetros de ancho. La longitud máxima es de 23 centímetros. Diseñe sus ilustraciones pensando en el tamaño final, procurando no dejar grandes espacios en blanco. Todas las tablas y figuras deberán ir acompañadas de una leyenda. Las leyendas deben consistir en explicaciones breves, suficientes para la comprensión de las ilustraciones por sí mismas. En las mismas se incluirá una explicación de cada una de las abreviaturas incluidas en la figura o tabla. Las leyendas se deben incluir al final del texto, tras las referencias bibliográficas y deben estar identificadas (ej: Tabla 1 Características...). Los mapas incluirán siempre el Norte, la latitud y la longitud.

Preparación del manuscrito para su envío

Texto

Grave su archivo de texto en un formato compatible con Microsoft Word.

Tablas y Figuras

Cada tabla y figura se guardará en un archivo distinto con número da tabla y/o figura. Los formatos preferidos para los gráficos son: Para los vectores, formato EPS, exportados desde el programa de dibujo empleado (en todo caso, incluirán una cabecera de la figura en formato TIFF) y para las ilustraciones en tonos de grises o fotografías, formato TIFF, sin comprimir con una resolución mínima de 300 ppp. En caso de enviar los gráficos en sus archivos originales (Excel, Corel Draw, Adobe Illustrator, etc.) estos se acompañarán de las fuentes utilizadas. El nombre de archivo de la figura (un archivo diferente por cada figura) incluirá el número de la ilustración. En ningún caso se incluirá en el archivo de la tabla o figura la leyenda, que debe figurar correctamente identificada al final del texto. El material gráfico escaneado deberá atenerse a los siguientes parámetros: Dibujos de líneas: el escaneado se realizará en línea o mapa de bits (nunca escala de grises) con una resolución mínima de 800 ppp y recomendada de entre 1200 y 1600 ppp. Figuras de medios tonos y fotografías: se escanearán en escala de grises con una resolución mínima de 300 ppp y recomendada entre 600 y 1200 ppp.

Recepción del manuscrito

Los autores enviarán un original y dos copias del artículo completo al comité editorial junto con una copia digital, acompañados de una carta de presentación en la que además de los datos del autor, figuren su dirección de correo electrónico y su número de fax, a la siguiente dirección:

IBADER

Comité Editorial da revista Recursos Rurais

Universidade de Santiago.

Campus Universitario s/n

E-27002 LUGO - Spain

Enviar el texto y cada una de las ilustraciones en archivos diferentes, en alguno de los siguientes soportes: CD-ROM o DVD para Windows, que irán convenientemente rotulados indicando su contenido. Los nombres de los archivos no superarán los 8 caracteres y no incluirán acentos o caracteres especiales. El archivo de texto se denominará por el nombre del autor.

O bien enviar una copia digital de los archivos convenientemente preparados a la dirección de e-mail: ibader@usc.es

Con los archivos incluya siempre información sobre el sistema operativo, el procesador de texto, así como sobre los programas de dibujo empleados en las figuras.

Copyright: Una vez aceptado el artículo para su publicación en la revista, el autor(es) debe firmar el copyright correspondiente.

Diciembre 2015

Recursos Rurais

Revista do Instituto de Biodiversidade Agrária e Desenvolvimento Rural (IBADER)

Selection process and manuscript evaluation

The articles, reviews and notes must be original, and will be previously evaluated by the Editorial Board and the Scientific Advisory Committee. Manuscripts submitted to Recursos Rurais will be subject to confidential review by two experts appointed by the Editorial Committee, which may also consider choosing reviewers suggested by the author. In cases of dispute the intervention of a third evaluator will be required. Finally it is for the Editorial Committee's decision on acceptance of work. In cases in which the reviewers suggest modifications to the submitted text, it will be the responsibility of the Editorial Team to inform the authors of the suggested modifications and to oversee the revision process. In cases in which the submitted manuscript is not accepted for publication, it will be returned to the authors together with the reviewers' comments. Please note that any manuscript that does not adhere strictly to the instructions detailed in what follows will be returned to the authors for correction before being sent out for review.

Instructions to authors

Editorial procedure

Recursos Rurais will consider for publication original research articles, notes and reviews relating to research and technological developments in the area of sustainable development of natural resources in the rural and conservation areas contexts, in the fields of conservation, biodiversity and environmental management, management of agricultural, livestock and forestry production systems, and land-use planning.

Manuscript preparation

General remarks

Articles may be submitted in Galician, Spanish, Portuguese, French or English.

Manuscripts should be typed on A4 paper, and should not exceed 15 pages including tables, figures and the references list. All pages should be numbered (though references to page numbers should not be included in the text). The manuscript should be written with Microsoft Word or a Word-compatible program, on one side of each sheet, with double line-spacing, 2.5 cm margins on the left and right sides, Arial font or similar, and font size 11. Neither tabs nor indents should be used, in either the text or the references list. Paragraphs should not be separated by blank lines.

Species and genus names should be written in italics. Genus names may be abbreviated (e.g. *Q. robur* for *Quercus robur*), but must be written in full at first mention. SI (Système International) units should be used. Technical nomenclatures and style should follow the most recent edition of the CBE (Council of Biology Editors) Style Manual.

Title page

The title page should include a concise and informative title (in the language of the text and in English), the name(s) of the author(s), the institutional affiliation and address of each author, and the e-mail address, telephone number, fax number, and postal address of the author for correspondence.

Abstract

Each article should be preceded by an abstract of no more than 200 words, summarizing the most important results and conclusions. In the case of articles not written in English, the authors should supply two abstracts, one in the language of the text, the other in English.

Key words

Five key words, not included in the title, should be listed after the Abstract.

Article structure

This should where possible be as follows: Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Acknowledgements, References. Section headings should be written in bold with font size 12. If subsection headings are required, these should be written in italics with font size 11, and should not be numbered.

Introduction

This section should briefly review the relevant literature and clearly state the aims of the study.

Material and Methods

This section should be brief, but should provide sufficient information to allow replication of the study's procedures.

Results and Discussion

This section should present the results obtained as clearly and concisely as possible, where appropriate in the form of tables and/or figures. Very large tables should be avoided. Data in tables should not repeat data in figures, and vice versa. The discussion should consist of interpretation of the results and of their significance in relation to previous studies. A short conclusion subsection may be included if the authors consider this helpful.

Acknowledgements

These should be as brief as possible. Grants and other funding should be recognized. The names of funding organizations should be written in full.

References

The references list should include only articles that are cited in the text, and which have been published or accepted for publication. Personal communications should be mentioned only in the text. The citation in the text should include both author and year. In the references list, articles should be ordered alphabetically by first author's name, then by date.

Examples of citation in the text:

Similar results have been obtained previously (Fernández 2005a, b; Rodrigo et al. 1992).

Andrade (1949) reported that...

According to Mario & Tinetti (1989), the principal factors are...

Moore et al. (1991) suggest that...

Examples of listings in References:

Journal article:

Mahaney, W.M.M., Wardrop, D.H. & Brooks, P. (2005). Impacts of sedimentation and nitrogen enrichment on wetland plant community development. *Plant Ecology*. 175, 2: 227-243.

Book chapter:

Campbell, J.G. (1981). The use of Landsat MS ata for ecological mapping. In: Campbell J.G. (Ed.) *Matching Remote Sensing Technologies and Their Applications*. Remote Sensing Society, London.

Lowell, E.M. & Nelson, J. (2003). Structure and Morphology of Grasses. In: R.F. Barnes et al. (Eds.). *Forages: An Introduction to Grassland Agriculture*. Iowa State University Press. Vol. 1. 25-50.

Complete book:

Jensen, W. (1996). *Remote Sensing of the Environment: An Erath Resource Perspective*. Prentice-Hall, Inc., Saddle River, New Jersey.

Standard series:

Tutin, T.G. et al. (1964-80). *Flora Europaea*, Vol. 1 (1964); Vol. 2 (1968); Vol. 3 (1972); Vol. 4 (1976); Vol. 5 (1980). Cambridge University Press, Cambridge, UK

Institutional publications:

MAPYA (2000). *Anuario de estadística agraria*. Servicio de Publicaciones del MAPYA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), Madrid, Spain.

Legislative documents:

BOE (2004). Real Decreto 1310/2004, de 15 de enero, que modifica la Ley de aprovechamiento de residuos ganaderos. BOE (Boletín Oficial del Estado), no. 8, 15/104, Madrid, Spain.

Electronic publications:

Collins, D.C. (2005). *Scientific style and format*. Available at: <http://www.councjnrc.org/publications.cfm> [5 January 2005]

Articles not published but accepted for publication:

Such articles should be listed in References with the name of the journal and other details, but with "in press" in place of the year of publication.

Figures and tables

Numbering:

All figures (data plots and graphs, photographs, diagrams, etc.) and all tables should be cited in the text, and should be numbered consecutively.

Figure quality. Please send high-quality copies. Line thickness in the publication-size figure should be no less than 0.2 mm. In the case of greyscale figures, please ensure that the different tones are clearly distinguishable. Labels and other text should be clearly legible. Scale should be indicated by scale bars. Maps should always include indication of North, and of latitude and longitude. Colour figures can be published.

Figure size

Figures should be no more than 17.5 cm in width, or no more than 8.5 cm in width if intended to fit in a single column. Length should be no more than 23 cm. When designing figures, please take into account the eventual publication size, and avoid excessively white space.

Figures and table legends

All figures and tables require a legend. The legend should be a brief statement of the content of the figure or table, sufficient for comprehension without consultation of the text. All abbreviations used in the figure or table should be defined in the legend. In the submitted manuscript, the legends should be placed at the end of the text, after the references list.

Preparing the manuscript for submission

Text

The text should be submitted as a text file in Microsoft Word or a Word-compatible format.

Tables and figures

Each table and each figure should be submitted as a separate file, with the file name including the name of the table or figure (e.g. Table-1.DOC). The preferred format for data plots and graphs is EPS for vector graphics (though all EPS files must include a TIFF preview), and TIFF for greyscale figures and photographs (minimum resolution 300 dpi). If graphics files are submitted in the format of the original program (Excel, CorelDRAW, Adobe Illustrator, etc.), please ensure that you also include all fonts used. The figure or table legend should not be included in the file containing the figure or table itself; rather, the legends should be included (and clearly numbered) in the text file, as noted above. Scanned line drawings should meet the following requirements: line or bit-map scan (not greyscale scan), minimum resolution 800 dpi, recommended resolution 1200 - 1600 dpi. Scanned halftone drawings and photographs should meet the following requirements: greyscale scan, minimum resolution 300 dpi, recommended resolution 600 - 1200 dpi.

Manuscript submission

Please submit a digital copy of the files properly prepared to the e-mail address:

info@ibader.gal

Or send a) the original and two copies of the manuscript, b) copies of the corresponding files on CD-ROM or DVD for Windows, and c) a cover letter with author details (including e-mail address and fax number), to the following address:

IBADER,
Comité Editorial de la revista Recursos Rurais,
Universidad de Santiago,
Campus Terra s/n,
E-27002 Lugo,
Spain.

As noted above, the text and each figure and table should be submitted as separate files, with names indicating content, and in the case of the text file corresponding to the first author's name (e.g. Alvarez.DOC, Table-1.DOC, Fig-1.EPS). File names should not exceed 8 characters, and must not include accents or special characters. In all cases the program used to create the file must be clearly identifiable.

Copyright

Once the article is accepted for publication in the journal, the authors will be required to sign a copyright transfer statement.

