

ALTERNATIVAS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL EN TOXICOLOGÍA: SITUACIÓN ACTUAL

María Pilar Vinardell Martínez-Hidalgo*

Resumen: La toxicología reguladora ha puesto cada vez mayor énfasis en la evaluación de los riesgos que presentan las sustancias químicas sobre la salud pública y ambiental, para lo cual realiza ensayos con animales. Debido a la presión pública y a la de los mismos científicos, existe una tendencia creciente a aplicar el principio de tres R en la investigación con animales, hecho que se manifiesta en las propias legislaciones de los países. Todo ello ha llevado a la investigación de métodos alternativos a los tradicionales.

En esta revisión se muestran los principales métodos alternativos desarrollados con el fin de reemplazar a los animales de laboratorio, reducir su número o refinar las técnicas utilizadas en los ensayos toxicológicos obligatorios antes de la puesta en el mercado de nuevos productos.

Palabras clave: experimentación animal, toxicología, alternativas, principio de las tres R, validación

ALTERNATIVES TO ANIMAL EXPERIMENTATION IN TOXICOLOGY: PRESENT SITUATION

Abstract: Toxicology rules are placing greater emphasis on the evaluation of risks posed by chemical substances on public and environmental health and with this goal, studies with animals have been used. Due to public and scientific pressure there is an increasing tendency to apply the principle of the three Rs in research with animals, fact observed in national legislations. All of this has promoted research on alternative methods different from traditional ones.

In this review, the main alternative methods are shown with the goal to replace laboratory animals, to reduce their amount or to refine the techniques used in obligatory toxicology essays before new products are placed on the market.

Key words: animal experimentation, toxicology, alternatives, three Rs principle, validation

ALTERNATIVAS À PESQUISA ANIMAL EM TOXICOLOGIA: SITUAÇÃO ATUAL

Resumo: A toxicologia reguladora tem enfatizado sempre mais a avaliação dos riscos que apresentam as substâncias químicas sobre a saúde pública e ambiental, para o qual realiza ensaios com animais. Devido à pressão pública e dos cientistas, existe uma tendência crescente de se aplicar este princípio dos tres R na pesquisa com animais, fato que se manifesta nas próprias legislações dos países. Tudo isto levou para a pesquisa, métodos alternativos em relação aos tradicionais. Nesta revisão são apresentados os principais métodos alternativos como objetivo de substituir os animais de laboratório, reduzir seu número ou aperfeiçoar as técnicas utilizadas nos ensaios toxicológicos obrigatórios antes de se colocar no mercado novos produtos.

Palavras chave: Experimentação animal, toxicologia, alternativas aos princípios dos três R, validação

* Profesora Titular de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España
Correspondencia: mpvinardellmh@ub.edu

Sobre el concepto “alternativa”

El término “alternativa a la experimentación animal” puede llevar a confusión y sugerir que se refiere sólo a aquellos métodos que los sustituyen en la investigación, como, por ejemplo, los métodos *in vitro*. En realidad, se consideran bajo este concepto todos aquellos que cumplen con alguno de los postulados del principio de las tres R.

Este principio surgió en 1959, cuando Russell y Burch publicaron el libro “*The Principles of Humane Experimental Technique*”(1). Las tres R se refieren a *reemplazar* los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, *reducir* su número cuando sea necesario utilizarlos y *refinar* las técnicas para aminorar su sufrimiento. Según dichos autores, lo ideal es reemplazar los animales por otros métodos, aunque, en muchos casos, por la necesidad de experimentar con ellos, sólo se pueda aspirar a la reducción y el refinamiento. Después de 20 años se reconoció el valor del principio, sólo cuando la comunidad científica y el público empezaron a preocuparse por el uso de animales de experimentación, especialmente en ensayos con fines reguladores.

Toxicología reguladora

En la actualidad, la toxicología alcanza enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada “toxicología reguladora”.

Los ensayos de toxicología reguladora que se realizan con animales siguen unos protocolos bien definidos para proteger a los trabajadores durante la producción del producto y durante su transporte y para resguardar al consumidor y al medio ambiente.

Existen protocolos de los diferentes ensayos toxicológicos que se realizan *in vivo*, de acuerdo con los criterios de la *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). En éstos se han introducido diferentes criterios de reducción del número de animales y de refinamiento de las técnicas, si bien existen pocos métodos de reemplazo que hayan sido aceptados en el plano legislativo.

La armonización de los protocolos utilizados en todo el mundo ha reducido de forma significativa el uso de animales con estos fines. Desde 1982 la OECD fue la primera organización internacional en establecer unos criterios de armonización de los ensayos realizados en animales, siendo aceptados por todos los países miembros de dicha organización. De manera similar, existe desde 1990 una armonización en los ensayos de seguridad realizados con fármacos(2).

Desde mediados de los años 60, los estudios de toxicidad se han desarrollado en numerosos laboratorios de todo el mundo y existe obligación de realizar ensayos con los productos nuevos que salen en el mercado (ver tabla 1). En el caso de productos farmacéuticos o material que pueda entrar en contacto con el torrente sanguíneo, es necesario realizar pruebas específicas, como es el caso del ensayo de pirógenos(3,4).

Tabla 1. Ensayos de seguridad con fines reguladores
<ul style="list-style-type: none">• Toxicidad aguda sistémica (oral, dérmica, inhalación)• Irritación y corrosión ocular• Irritación y corrosión dérmicas• Sensibilización dérmica• Penetración dérmica• Toxicidad subaguda• Toxicidad subcrónica• Toxicidad crónica• Toxicocinética• Neurotoxicidad• Teratogenia y embriotoxicidad• Toxicidad reproductiva• Genotoxicidad• Carcinogénesis

Los estudios de toxicidad aguda implican la determinación de la dosis, lo que provoca la muerte del 50% de los animales tratados. En este tipo de ensayos se provoca la muerte de un importante número de animales después de una única administración del producto. En muchos casos, los animales padecen sufrimiento antes de su muerte. Similares son los estudios de toxicidad subaguda, subcrónica y crónica, aunque en estas situaciones los animales son administrados repetidamente por períodos que abarcan desde 14 días a varios meses.

Los ensayos de irritación ocular consisten en la administración de los productos directamente en el ojo de un conejo, que es el animal de elección. El método tradicional de estudio de la irritación y la corrosión ocular *in vivo* se ha venido realizando mediante el denominado “ensayo de Draize”(5), con muchos detractores debido a su agresividad, a su subjetividad y a la falta de correlación con los efectos reales en humanos(6,7).

Una variante del ensayo es la determinación de irritación dérmica en la piel del conejo luego de ser rasurada, que también resulta muy subjetiva, ya que la valoración de las lesiones ocasionadas es realizada por un experimentador que determina el grado de inflamación o de enrojecimiento provocado en la piel después de la aplicación del producto en estudio.

Los ensayos de sensibilización mediante el método de maximización realizado en cobayos son los más utilizados. Dicho método fue descrito por Magnusson y Kligman en 1969(8). Se rasura la piel del cobayo y se inyecta intradérmicamente el producto junto con adyuvante de Freund para potenciar el efecto sensibilizante. Una semana después se aplica el producto tópicamente y se mantiene durante 48 horas mediante un vendaje oclusivo. A los 21 días se vuelve a aplicar y se mantiene durante 24 horas; después de retirar el apósito y el producto, se

valora la aparición de edema o eritema luego de 48 y 72 horas de su aplicación. El ensayo es largo, ya que se tarda más de 21 días y requiere el uso de numerosos animales, entre controles y tratados.

Los estudios de absorción cutánea se han venido realizado *in vivo*, tanto en animales como en voluntarios humanos, según el procedimiento 427 de la OECD(9).

La mutagénesis se refiere a la inducción de cambios permanentes y transmisibles en la estructura del material genético, afectando a un único gen o a varios. Genotoxicidad es la capacidad de una sustancia para interactuar con el DNA. Los ensayos de genotoxicidad y mutagénesis son importantes para evaluar el riesgo de los productos. Debido a que son fenómenos complejos, no existe un único ensayo capaz de detectar estas alteraciones.

Se han venido utilizando diferentes métodos con animales y evaluando las alteraciones genéticas observadas, como en el ensayo de mutación genética en células de mamífero (preferentemente linfoma de ratón). El ensayo del micronúcleo en eritrocito de mamífero determina si un producto provoca o no cambios en la estructura y número de cromosomas(10).

El desastre provocado por la talidomida en los años 50 y 60 originó la necesidad de ensayar los productos por posibles efectos sobre los fetos. La toxicidad reproductiva se refiere a los efectos adversos provocados por una sustancia en cualquier etapa del ciclo reproductivo, afectando las funciones o provocando alteraciones en el embrión, como malformaciones, retraso en el crecimiento o muerte. Debido a la complejidad del proceso reproductivo, es difícil tener un modelo *in vitro* que detecte todas las posibles alteraciones. Sin embargo, el ciclo se puede dividir en diferentes etapas y es posible estudiar por separado cada una de ellas.

En la actualidad, estos ensayos se hacen *in vivo*, administrando el producto a ratas o ratones durante un cierto tiempo antes de la gestación y, posteriormente, se observan las alteraciones en la crías o en la capacidad reproductiva de los animales. El ensayo se puede extender a dos generaciones. También se puede iniciar la administración a partir del primer día de gestación y observar las alteraciones en los fetos(11-14).

Una sustancia se considera carcinogénica si es capaz de inducir tumores benignos o malignos o si aumenta la incidencia de estos últimos. La complejidad del proceso hace difícil extrapolar los resultados de la experimentación animal al hombre(15).

Los ensayos de neurotoxicidad se realizan en roedores a los que se administra el producto en una única dosis o en dosis repetidas y se observa la respuesta motora, el comportamiento, las respuestas neurofisiológicas, entre otros aspectos(16).

Como puede observarse, para los estudios de toxicología reguladora todavía se utiliza un gran número de animales, siguiendo procedimientos que, en muchos casos, fueron descritos hace más de 50 años. Sin embargo, la aceptación de nuevos métodos por las autoridades es difícil, ya que éstas estiman que la salud pública se puede ver comprometida si el método alternativo no es tan seguro y fiable como el tradicional *in vivo* que se pretende reemplazar.

Los avances actuales en muchos campos de la investigación biomédica permiten que muchos de los estudios que antes se podían realizar únicamente con animales se realicen ahora utilizando cultivos celulares u otros procedimientos. Sin embargo, éstos tienen que ser validados para garantizar la seguridad del ser humano.

Validación

Validar consiste en dar fuerza o firmeza a algo, hacerlo aceptable. En el caso de un método alternativo, se tiene que establecer su fiabilidad y relevancia para reemplazar al método tradicional que utiliza animales de laboratorio. Este proceso es lento y comprende desde la validación interna hasta la posterior aceptación por las autoridades reguladoras(17-19).

Existen varios organismos encargados de la validación de métodos alternativos. En Europa existe el *European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), fundado en 1991 por el Parlamento Europeo en respuesta a la Directiva 86/609/EEC de protección de los animales de laboratorio utilizados en experimentación y otros fines científicos. Esta directiva indica la necesidad de que la comisión y los países miembros den apoyo, de forma activa, al desarrollo, validación y aceptación de métodos que puedan reducir, refinar y reemplazar el uso de animales de laboratorio. Entre las funciones de ECVAM está promover la aceptación científica y reguladora de los ensayos sin animales, mediante la investigación, el desarrollo y validación de métodos y el establecimiento de una base de datos especializada.

En Estados Unidos, *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), con funciones similares a las de ECVAM, establece estrechos lazos de cooperación para avanzar en la búsqueda y validación de métodos alternativos. En Japón, la *Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments* (JSAAE) ha realizado varios estudios de validación sometidos a la evaluación del Ministerio de Salud y Bienestar.

Entre el gran número de estudios de validación que han tenido lugar en los últimos años en Europa, Estados Unidos y Japón, hay que resaltar los realizados sobre métodos para

evaluar la irritación ocular(20-22), irritación dérmica, fototoxicidad(23), pirógenos(24,25), embriotoxicidad(26) y sensibilización(27).

Ventajas de los métodos *in vitro*

En este ámbito, sirven para estudiar el mecanismo de acción de un determinado agente tóxico, tanto para caracterizar dicho mecanismo como para entender la biología básica de un sistema. Se ha avanzado mucho en los últimos años en estos conceptos, especialmente en el campo de la genómica. Permiten, con un único experimento, evaluar los cambios en la expresión genética que tienen lugar en una célula, tejido u órgano por el efecto tóxico de una determinada sustancia(28).

El principal problema para determinar la viabilidad de un método *in vitro* es la dificultad de comparar estos resultados, basados en el mecanismo de acción de un compuesto, con los obtenidos *in vivo*. Los métodos *in vitro* son muy fiables pero, debido a que son más restrictivos, sólo sirven para predecir la toxicidad de un determinado tipo de sustancias o de un aspecto concreto del proceso de toxicidad, por lo cual es necesario realizar una batería de ensayos.

A pesar de que se efectúan ensayos *in vitro* desde hace más de dos décadas, la legislación en Europa hace hoy más necesaria su utilización. Los ensayos de productos cosméticos acabados están prohibidos y entre 2009 y 2013 se prohibirán también los ensayos de materia primas.

Desarrollo de métodos alternativos

En los últimos años, por razones éticas, económicas o científicas, se ha trabajado mucho para encontrar alternativas a los métodos tradicionales aplicados con fines reguladores. A continuación, se detallan algunas de las más relevantes en los diversos tipos de toxicidad.

Toxicidad aguda sistémica (oral, dérmica, inhalación)

Como alternativa al ensayo de toxicidad aguda se han propuesto diferentes métodos basados en la citotoxicidad en diferentes líneas celulares y midiendo diferentes parámetros indicativos de la toxicidad. Una de las líneas celulares es la de hepatoma HepG2, en la que se determina el contenido de proteínas(29). También se utilizan líneas de queratinocitos o de fibroblastos, como las 3T3, en las que se establece la captación del colorante rojo neutro(30). Este último método se ha sugerido para definir la dosis inicial en los ensayos de toxicidad aguda que aún deben realizarse obligatoriamente en animales de experimentación(31).

Por último, se han desarrollado diferentes softwares o, como se conocen en la actualidad, métodos *in silico*, basados en el análisis estadístico de la relación estructura química-actividad (QSAR)(32). Estos métodos operan a partir del análisis de una gran cantidad de información toxicológica obtenida de la literatura para una gran diversidad de productos. Entre estos modelos hay que destacar TOPKAT(33,34).

Irritación y corrosión ocular

Debido a la crueldad y subjetividad del método de irritación ocular es uno de los ensayos que ha suscitado mayor número de investigaciones para buscar alternativas(35-37). Existen métodos que utilizan órganos aislados como el de la opacidad y permeabilidad de la córnea bovina (BCOP), el ojo aislado de conejo y el ojo de pollo(38-40). Otros son métodos organotípicos, como los basados en la utilización de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina(41-43). Existen modelos de tejido humano reconstituido, como el EpiOcular® y el epitelio corneal humano reconstituido de SkinEthic(44). Métodos basados en la citotoxicidad de células de diferentes tipos, como

las que se encuentran en el epitelio y endotelio ocular, midiendo la captación o liberación de colorantes, o la hemólisis de los eritrocitos(45-47). Procedimientos basados en la alteración de la función celular, como el ensayo de fluoresceína o el del microfisiómetro de silicona(48,49). Otros métodos se basan en la alteración de una matriz proteica de composición similar a la de la córnea humana en el EYTEX® o en el IRRITECTION®, o el ensayo que utiliza babosas midiendo la producción de moco como índice de irritación(50, 51). En general, todos ellos intentan reproducir *in vitro* los fenómenos que tienen lugar *in vivo* cuando el producto entra en contacto con el ojo.

Irritación y corrosión dérmica

Los métodos *in vitro* deben reproducir las respuestas que tienen lugar en el organismo por efecto de los productos. Es necesario conocer la estructura de la piel y de las células que son responsables de estos fenómenos. En la piel existe una primera capa o epidermis, en la cual los queratinocitos son las células mayoritarias, y una capa más interna o dermis con numerosos fibroblastos. Los ensayos de irritación dérmica tienen en cuenta los fenómenos que suceden en la piel, tales como la liberación de citoquinas que provocan cambios morfológicos (vasodilatación, activación de células endoteliales, etc.) y que se traducen en síntomas visibles (eritema, edema y dolor o picor)(52).

Los *kits* comerciales tienen la ventaja de permitir la aplicación directa de los preparados. Numerosas empresas han desarrollado estos productos que tienen el inconveniente de ser costosos. El *kit* Irritection® se basa en la utilización de una matriz con colágeno y gelatina para imitar a la piel. El producto se aplica y si es irritante provoca cambios en la matriz que pueden ser detectados por una turbidez. SkinEthic™ intenta semejar la piel completa con sus capas: se valora, después de la aplicación

del producto, la viabilidad celular, la presencia de citoquinas y los cambios histológicos del tejido. Otros modelos son EpiDerm™, que sólo equivale a la epidermis, y EpiDermFT™, que simula dermis y epidermis. En la actualidad estos métodos se han aceptado para valorar exclusivamente productos corrosivos; por lo tanto, son útiles sólo para evaluar químicos y no sirven para los dermofarmacéuticos(53).

Carcinogénesis

Hoy se utilizan animales transgénicos con el fin de inducir en menos tiempo la aparición de tumores. Los animales tienen una transformación genética que afecta a un gen relacionado con la aparición de tumores, pero no la suficiente como para que se manifieste; lo que hace un producto carcinogénico, por lo tanto, es acelerar el proceso. Un ejemplo es el ratón p53+/- con un mayor riesgo de desarrollar tumores en tan sólo 26 días de exposición a un producto carcinogénico(54).

Como métodos *in vitro* se ha propuesto la utilización de determinadas líneas celulares, como las células de embrión de hamster sirio (SHE)(55) o células obtenidas de próstata, como la C3H10T_{1/2}(56).

Métodos aceptados

A pesar del gran esfuerzo realizado en el desarrollo de métodos alternativos, son pocos los totalmente aceptados por las autoridades reguladoras. La OECD ha aprobado tres métodos de reducción y refinamiento de la toxicidad aguda: el de la dosis fija(57), el de la clase tóxica aguda(58) y el método arriba y abajo(59). Desde 2002 se ha eliminado el procedimiento clásico de determinación de la dosis letal o DL50. Los métodos admitidos permiten determinar una dosis aproximada que provoca toxicidad aguda por vía oral y, también, clasificar a los productos en función de dicha toxicidad.

Desde los años 90 se han realizado varios estudios de validación de alternativas *in vitro* al ensayo de irritación ocular(60). En la actualidad, se ha refinado el método para reducir el sufrimiento de los animales(61), validando cuatro alternativas *in vitro* con fines reguladores para identificar productos irritantes severos y para el etiquetado de productos peligrosos. Entre estos métodos esta el de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina o HET-CAM, que utiliza huevos fecundados de nueve días de incubación(41); el método del ojo aislado, obtenido de conejos que se hayan sacrificado con otros fines(40); el ensayo de opacidad y permeabilidad de la córnea bovina, que utiliza córneas obtenidas del matadero(38), y el método del ojo aislado de pollo, obtenido también del matadero(39). De todos modos, estos procedimientos tienen algunas limitaciones: si se obtiene un resultado positivo en uno de los cuatro métodos no es necesario realizar más ensayos con animales; si el producto da un resultado negativo se debe realizar el ensayo en uno a tres conejos para confirmar los resultados. En Francia y Alemania, entre otros países europeos, las autoridades reguladoras han aceptado el método HET-CAM para ensayar la seguridad de cosméticos.

El ensayo de irritación/corrosión dérmica en conejos ha sido recientemente reemplazado en los países miembros de la Unión Europea por dos ensayos *in vitro*. En 2000 se aceptaron por primera vez dos métodos *in vitro*, según la Directiva de la Unión Europea. Estos ensayos son el de resistencia transepidérmica (TER), que mide la conductividad eléctrica a través de la piel aislada de conejo (también adoptado en 2004 por la OECD)(62), y el método Episkin®, que utiliza un modelo comercial de piel humana(63). También, en 2004 se aceptó otro método para valorar la corrosión(64) y un protocolo para estudiar la absorción y penetración cutánea utilizando un método *in vitro* que utiliza

piel humana procedente de operaciones(65). El ensayo sustituirá al que se realizaba *in vivo* en la rata, obligatorio para evaluar productos acabados, cosméticos, pesticidas y biocidas.

La OECD aceptó en 2002 un método para ensayar el potencial efecto sensibilizante de los productos. El procedimiento se denomina “de nódulo linfático” y utiliza ratones en lugar de los cobayos que se usaban tradicionalmente en este tipo de ensayos. Se trata de un método en que se ha aplicado el refinamiento de las técnicas para reducir el sufrimiento de los animales y aparece, asimismo, en los protocolos de la OECD(66).

Otro método es el ensayo de fototoxicidad: se realiza *in vitro* utilizando una línea celular de fibroblastos (las células 3T3) y determina la captación de rojo neutro. El ensayo recibe el nombre de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU (siglas en inglés)(67).

Para los ensayos a largo plazo, únicamente se ha aceptado la aplicación de criterios de refinamiento y reducción del número de animales(68).

Conclusiones

A pesar del gran esfuerzo realizado en los últimos años para buscar métodos alternativos que puedan suplir a los ensayos con animales, todavía no hay muchos totalmente aceptados por las autoridades reguladoras. Es difícil su implantación porque, en primer lugar, hay cierta reticencia para su total aceptación y, en segundo, porque debe pasar algún tiempo desde que se desarrolla un método hasta que es validado y posteriormente aceptado por las autoridades reguladoras.

Sin embargo, el desarrollo de la investigación biomédica permite que muchos estudios que hasta hace algunos años sólo podían rea-

lizarse con animales hoy puedan hacerse *in vitro*, aportando una mayor información sobre los mecanismos implicados en el proceso. Se sigue trabajando para buscar alternativas a los ensayos de toxicidad. A pesar de las dificultades para su aceptación, no se pierde la esperanza de que muchos de estos métodos sean totalmente abolidos en los próximos años.

Referencias

1. Russell WMS, Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London; Methuen & Co Ltd; 1959.
2. D'Arcy PF, Harron DWG, (eds.) *Proceedings of the Third International Conference of Harmonization (ICH) Yokohama*. Belfast UK: The Queens University of Belfast; 1995.
3. Bangham DR. Relevance and standardization in pyrogen tests. *Journal de Pharmacie de Belgica* 1979; 34(3):134-6.
4. Zaldivar RA, Haning JP Two different modes of carrying rabbits for the antibiotic pyrogenicity test. *Journal of the Parenteral Drug Association* 1978; 32(6):295-7.
5. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 1944; 82:377-90.
6. Griffith JF, Nixon GA, Bruce RD. Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the humane eye. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1980; 55:501-13.
7. York M, Steiling W. A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. *Journal of Applied Toxicology*. 1998; 18:233-40.
8. Magnusson B, Kligman AM The identification of contact allergen by animal assay. The guinea pig maximization test. *Journal of Investigative Dermatology* 1969; 52:268-76.
9. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 427: Skin absorption in vivo method. 2004.
10. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 474: Mammalian erythrocyte micronucleus assay. 1987.
11. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 414: Prenatal Development Toxicity Study. 2001.
12. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 415: One-generation reproduction Toxicity Study. 1983.
13. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 416: Two-generation reproduction Toxicity Study. 2001.
14. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. 1995.
15. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 451: Carcinogenicity Studies. 1981.
16. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 424: Neurotoxicity Study in Rodents. 1997.

17. Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *Alternatives to Animal Experimentation* 2003; 20:3-61.
18. Halder M, Balls M Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing: possibilities and obstacles--the view of the validator. *Developmental Biology (Basel)* 2002;111:199-206.
19. Combs RD. The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods. *Alternatives to Laboratory Animals* 2002; 30:151-65.
20. Balls M, Botham PA, Bruner LH, Spielmann H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 1995; 9:871-929.
21. Ohno Y, Kaneko T, Inoue T, Morikawa Y, Yoshida T, Fujii A et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in vitro* 1999; 13:73-98.
22. Spielmann H, Liebsch M, Kalweit S, Moldenhauer F, Wirnsberger T, Holzhutter HG et al. Results of a validation study in Germany on two *in vitro* alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. *Alternatives to Laboratory Animals* 1996; 24:741-858.
23. Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJW, Pechovitch G, de Silva O et al. The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). Part I: The 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in vitro* 1998; 12:305-27.
24. Hoffman S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Poole S, Mistry Y. et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *Journal of Immunological Methods* 2005; 298(1-2):161-73.
25. Schindler S, Hartung T. Comparison and validation of novel pyrogen tests based on the human fever reaction. *Developmental Biology (Basel)* 2002;111:181-6.
26. Genschow E, Spielmann F, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A. et al. The ECVAM international validation study of *in vitro* embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *Alternatives to Laboratory Animals* 2002; 30:151-76.
27. Gerberick GF, Ryan CA, Kimber I, Dearman RJ, Lea LJ, Basketter DA. Local lymph node assay: validation assessment for regulatory purposes. *American Journal of Contact Dermatitis* 2000; 11(1):3-18.
28. Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett, JC, Afshari CA. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Molecular Carcinogenesis* 1999; 24:153-9.
29. Dierichx P. Cytotoxicity testing of 114 compounds by the determination of the protein content in Hep G2 cell cultures. *Toxicology in vitro* 1989; 3:189-93.
30. Borenfreund E, Puerner J. Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 1985; 24:119-24.
31. Available in: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/brdvalstdy.htm>
32. Dearden JC In silico prediction of drug toxicity. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2003; 17(2-4):119-27.
33. Cronin MTD, Jaworska JS, Walker JD, Comber MHI, Watts CD, Worth AP. Use of QSARs in International

- Decision-Making Frameworks to Predict Health Effects of Chemical Substances. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111:1391-401.
34. Venkatapathy R, Moudgal CJ, Bruce RM. Assessment of the oral rat chronic lowest. Observed adverse effect level model in TOPKAT, a QSAR software package for toxicity prediction. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 2004; 44(5):1623-9.
 35. Wilhemus KR. The Draize Eye Test. *Survey of Ophthalmology* 2001; 45 (6): 493-515.
 36. Prinsen MK. The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in vitro* 2006; 20(1):78-81.
 37. Curren RD, Harbell JW. Ocular safety: a silent (*in vitro*) success story. *Alternatives to Laboratory Animals* 2002; 30:69-74.
 38. Gautheron P, Dukic M, Alix D, Sina JF. Bovine corneal opacity and permeability test: an *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundamental and Applied Toxicology* 1992; 18:442-9.
 39. Prinsen MK. The chicken enucleated eye test (CEET): a practical (pre)screen for assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food and Chemical Toxicology* 1996; 34:291-6.
 40. Berry M, Easty DL. (1993) Isolated human and rabbit eye: models of corneal toxicity. *Toxicology in vitro* 1993; 7: 461-4.
 41. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* 1985; 23:287-91.
 42. Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T, Tanaka M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals. Modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. *Toxicology in vitro* 1991; 5, 301-4.
 43. Vinardell MP, Macián M. Comparative study of the Het-Cam test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential. *Toxicology In vitro* 1993; 8: 467-70
 44. Stern M., Klausner M, Alvarado R, Reskers K, Dickens M. Evaluation of EpiOcular™ tissue model as an alternative to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 1996; 12:455-61.
 45. Pape WJW, Pfannenbecker U, Hoppe U. Validation of the red blood cell test system as *in vitro* assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Molecular Toxicology* 1987; 1:525-536.
 46. Zuang V. The neutral red release assay: a review. *Alternatives to Laboratory Animals* 2001; 29:575-99.
 47. Mitjans M, Martínez V, Clapés P, Pérez L, Infante MR, Vinardell MP. (2003). Low potential ocular irritation of arginine-based gemini surfactants and their mixtures with nonionic and zwitterionic surfactants. *Pharmaceutical Research* 2003; 20:1697-701.
 48. Catroux P, Rougier A, Dossou KG, Cottin M. The silicon microphysiometer for testing ocular toxicity *in vitro*. *Toxicology in vitro* 1993; 7:465-9.
 49. Cottin M, Zanvit A. Fluorescein leakage test: a useful tool in ocular safety assessment. *Toxicology in vitro* 1997; 11:399-405.

50. Gordon VC. The scientific basis of the EYTEX system. *Alternatives to Laboratory Animals* 1992; 20:537-48.
51. Adriaens E, Remon JP. The evaluation of an alternative mucosal irritation test using slugs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002; 182:169-75.
52. Coquette A, Berna N, Vandernbosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y. Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in *in vitro* reconstructed human epidermis for the prediction of *in vivo* skin irritation and/or sensitization. *Toxicology in vitro* 2003; 17:311-21.
53. Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics, *Toxicology in vitro* 2002; 16,:557-72.
54. Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A, Donohowe LA. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nature Genetic* 1993; 5:225-9.
55. Berwald Y, Sachs L. *In vitro* transformation of normal cells to tumours cells by carcinogenic hydrocarbons. *Journal of the National Cancer Institute* 1963; 35:641-61.
56. Mondal S, Heidelberger C. *In vitro* malignant transformation by methylcholanthrene of the progeny of single cells derived from C3H mouse prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1970; 65:219-25.
57. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001.
58. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001.
59. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 425: Acute Oral Toxicity –Up-and-Down Procedure, Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001.
60. OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No 401: Acute Oral Toxicity, Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. 1987.
61. OECD *Guideline for the Testing of Chemicals* No. 405: Acute eye Irritation/Corrosion. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. 2002.
62. OECD *Guideline for the Testing of Chemicals* No 430: *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) 2004.
63. Portes P, Grandidier MH, Cohen C, Roguet R. Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in vitro* 2002; 16: 765-770.
64. OECD *Guideline for the Testing of Chemicals* No 431 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test 2004.
65. OECD *Guideline for the Testing of Chemicals* No 428 Skin Absorption: *In Vitro* Method 2004.
66. OECD *Guideline for the Testing of Chemicals* No 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay 2002.

67. OECD *Guideline for the Testing of Chemicals* No 432 *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test 2004.
68. Spielmann H, Gerbracht U. The use of dogs as second species in regulatory testing of pesticides. Part II: Subacute, subchronic and chronic studies in the dog. *Archives of Toxicology* 2001; 75:1-21.

Recibido el 20 de diciembre de 2006.

Aceptado el 01 de marzo de 2007.