

RESEÑA

Métodos Alternativos en Toxicología

Rosa Ibis Meneau Hernández

Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Playa, Apartado Postal 6990, Habana, Cuba.
ibis.meneau@cnic.edu.cu

Recibido: 6 de noviembre de 2013.

Aceptado: 18 de diciembre de 2013.

Palabras clave: experimentación animal, toxicología, alternativas, principio de las tres R, validación, *in vitro*.

Key words: animal experimentation, toxicology, alternatives, 3R principles, validation, *in vitro*.

RESUMEN. El término alternativa en la experimentación animal describe cualquier cambio en los protocolos oficiales que contribuya al refinamiento de las técnicas, la reducción del número de animales utilizados o el reemplazo de los mismos. Estos principios se conocen como 3Rs y fueron definidos por Russell y Burch en su libro *The principles of humane experimental technique*. Las 3Rs provee una estrategia para el acercamiento racional a minimizar en los experimentos el uso y sufrimiento animal unido a un compromiso con la calidad del trabajo científico. La época moderna ha sumado argumentos (económicos, sociopolíticos y legales) que unidos a la evolución de los conocimientos científicos, apoyan la aplicación de las 3Rs y el desarrollo de métodos alternativos. Sin embargo, solo una pequeña parte de estos métodos son aceptados por las entidades reguladoras para emplearse en la evaluación de riesgo. Esto se debe a que es necesario que el protocolo haya sido científicamente validado y demostrado que es tan seguro y fiable como el método tradicional que pretende reemplazar. Esta revisión provee una breve perspectiva sobre el tema *alternativas en la experimentación animal* enfocada en la validación de los métodos y su descripción. Se enumeran ventajas y desventajas y se muestran los principales métodos aceptados internacionalmente.

ABSTRACT The term alternative to animal experimentation describes any change in official protocol that contributes to the refinement of techniques, the reduction of number of animals used or the replacement of them. These principles are known as 3Rs and were defined by Russell and Burch in their book, *The Principles of Humane Experimental Techniques*. The modern times has added arguments (economic, sociopolitical and legal) that together with the evolution of the scientific knowledge, support the 3Rs application and the development of alternative methods. However, only a small part of these methods is accepted by regulatory agencies, just to be used in the evaluation risk. Therefore it is necessary that the protocol has been scientifically validated. It should prove to be as safe and reliable as the traditional method in order to be replaced. It should also comply with several validation criteria that permit to define advantages and disadvantages of the test. This review provides a brief overview of the topic *alternatives in the animal* and focuses on validation of methods, and their description. The advantages and disadvantages of these methods are also listed and the most important internationally accepted methods were shown.

INTRODUCCION

El desarrollo de alternativas ha progresado vertiginosamente en los últimos años, debido a la evolución de los conocimientos científicos, sus aplicaciones tecnológicas y a consideraciones éticas, logísticas, económicas, sociopolíticas y legales.¹ El conocimiento sobre ellas y su uso en el diseño y desarrollo de estudios toxicológicos

ha devenido un aspecto fundamental de la toxicología moderna y ha alcanzado relevancia en otras disciplinas como biología básica y farmacología.²

El término *alternativa* en el contexto de la toxicología describe cualquier cambio, en los protocolos oficiales, que pueda derivar en el refinamiento de las técnicas con el fin de disminuir el estrés y evitar el sufrimiento infringido a los animales; reemplazo por sistemas que no requieren seres vivos o emplean otras especies inferiores en la escala filogenética y la reducción del número de animales empleado en cada ensayo. Estos términos se conocen comunmente como 3Rs en alusión a sus iniciales.^{3,4}

El concepto de las 3Rs fue desarrollado por Russell y Burch en su libro *The principles of humane experimental technique*, publicado en 1959; en el que describen las 3Rs como la principal ruta para alcanzar principios **humanos** en las técnicas experimentales y aportan una estrategia racional para minimizar el uso y sufrimiento de los animales de experimentación, unido a un compromiso con la calidad del trabajo científico.⁵

Desde 1986, el concepto de las 3Rs ha sido soportado por leyes en la Unión Europea. Posteriormente, países como Estados Unidos, Canadá, Japón y Corea lo incorporaron a sus legislaciones. Esto ha llevado a la elaboración de normativas que regulan el uso de animales vertebrados en experimentación cuya finalidad es asegurar la protección animal y evitar la duplicación inútil de procedimientos, así como la reducción al mínimo del número de animales utilizados, mediante la aplicación de métodos alternativos en lo posible.⁶⁻⁸

En el continente americano existen en Canadá, EE. UU. Algunos países de América Latina, regulaciones concernientes a los animales de laboratorio que se recogen en guías dirigidas a institutos de investigación y universidades.^{5,9,10} En Cuba, con el fin de poder cumplir con las regulaciones internacionales sobre la calidad de los animales de laboratorio, existe el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Además, el Centro Estatal para el Control de Medicamentos, Dispositivos y Equipos Médicos (CECMED) es la entidad encargada de regular las buenas prácticas durante la realización de estudios farmacológicos y toxicológicos preclínicos.^{9,11}

Un número importante de métodos alternativos ha sido desarrollado desde la publicación del principio de las 3Rs. La comunidad científica admite sin reservas la utilidad y los resultados obtenidos por diversos procedimientos *in vivo* e *in vitro* en la investigación de los efectos farmacológicos, mecanismos toxicodinámicos, procesos toxicocinéticos, etc. Sin embargo, solo una pequeña cantidad se encuentra aceptadas por las entidades reguladoras para ser utilizados en la evaluación del riesgo y el registro de un nuevo compuesto, puesto que es necesario que el protocolo haya sido validado científicamente y se haya; demostrado que es tan seguro y fiable como el método *in vivo* que pretende reemplazar.^{2,12}

Existen varios organismos encargados de la validación de métodos alternativos. Entre ellos el European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments (JSAAE) y más recientemente, Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM) y Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). Todos ellos promueven 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.²

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS.

El proceso de validación de métodos alternativos garantiza que sean científicamente validados y eventualmente aceptados por las autoridades reguladoras para la clasificación, etiquetado, producción y seguridad. Requieren ser validados, aquellos métodos empleados en la valoración de riesgo. Para otros objetivos, los métodos experimentales no han de seguir este proceso de validación y aceptación reguladora.^{13,14}

La validación es un proceso basado en principios científicos que demuestran la fiabilidad y relevancia de un ensayo, método o proceso desarrollado para un propósito específico.¹⁵ La fiabilidad es una medida objetiva de la reproducibilidad dentro de un laboratorio, cuando el ensayo se ha realizado siguiendo el mismo protocolo estandarizado. Mientras que la relevancia de un método de ensayo que describe la relación entre los efectos medidos y los biológicos en las especies afectadas. Esta relación se denomina modelo de predicción. El método alternativo ideal debe medir un hecho que sea lo más parecido posible al mecanismo de acción o bien se relacione con el efecto que interesa evaluar. Igualmente los resultados obtenidos a partir de él, se deben correlacionar con la salud humana, animal o aspectos ecológicos.¹⁶⁻¹⁸ Las mediciones requeridas para probar la fiabilidad y relevancia de un método son:¹⁹

- Sensibilidad: Porcentaje de sustancias positivas correctamente identificadas.
- Especificidad: Porcentaje de sustancias negativas correctamente identificadas.
- Nivel de Predicción: Porcentaje de predicciones para una clasificación particular.

- Precisión: Porcentaje total de clasificaciones correctas.

Otros indicadores evaluados durante la validación son:

- Reproducibilidad dentro de los laboratorios: concordancia de las clasificaciones entre tres y más series independientes en un laboratorio.
- Reproducibilidad entre los laboratorios: concordancia de las clasificaciones entre laboratorios.
- Probabilidad para la clasificación correcta.

Sin embargo, para que un nuevo método de ensayo toxicológico se considere validado debe cumplir una serie de criterios de validación que permitan definir perfectamente las características del ensayo, con sus ventajas y limitaciones. La armonización de estos criterios ha sido impulsada principalmente bajo los auspicios de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo OECD ECVAM e ICCVAM en colaboración con expertos externos y organizaciones nacionales de modo que no existan grandes diferencias entre países y continentes.¹⁷ En la progresión de nuevos ensayos desde su concepción hasta su aceptación pueden considerarse actualmente cinco fases (figura 1).^{19,20}

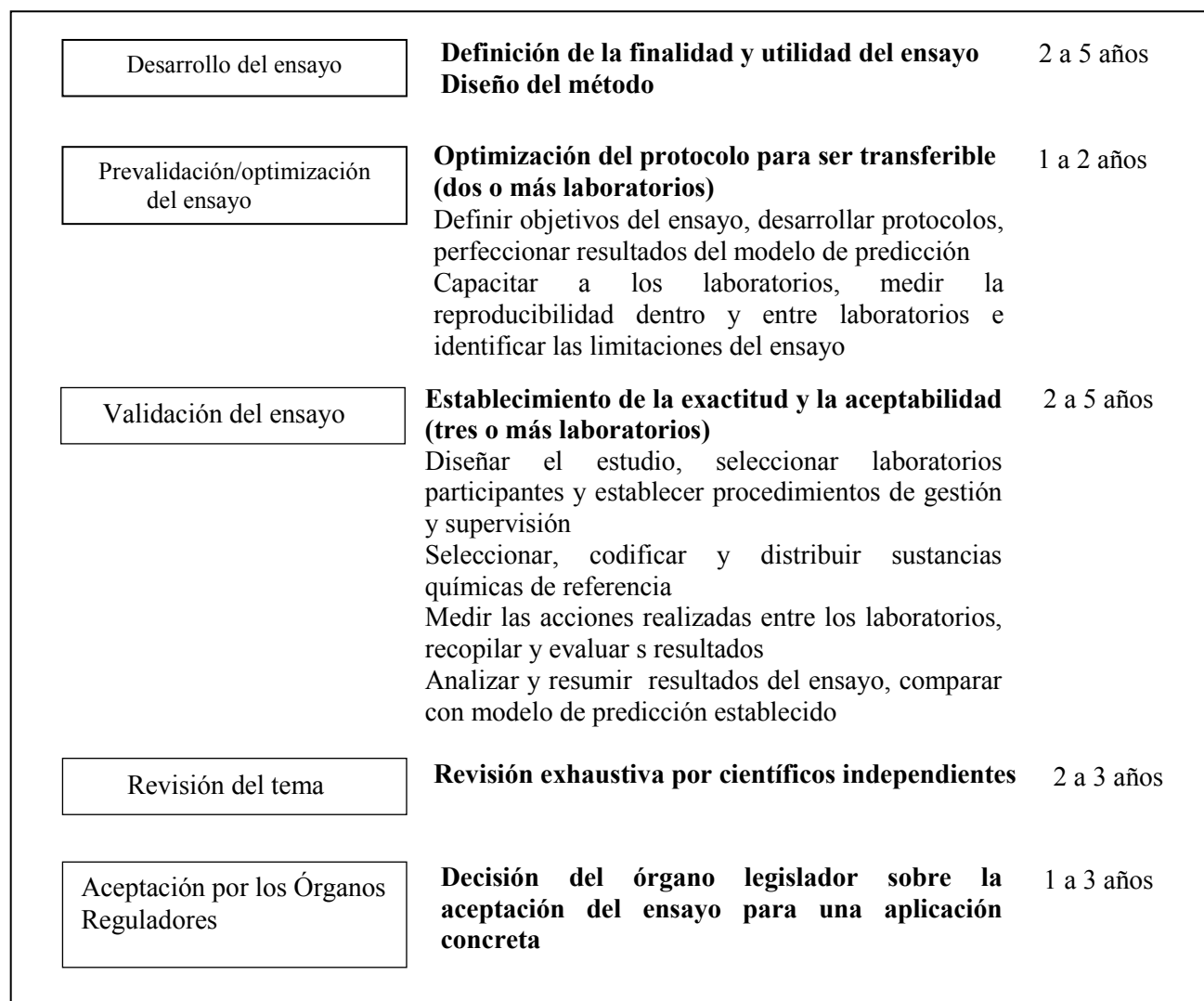


Fig.1. Esquema del proceso de validación prospectiva.

ALTERNATIVAS EN LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Existe un amplio abanico de técnicas o abordajes (biológicos y no biológicos) que pueden considerarse apropiados como alternativas que permiten alcanzar los principios promulgados por Russell y Burch: refinamiento, reducción,

reemplazo.⁵ Principios que además, deben ser observados durante el diseño y desarrollo de todo estudio que implique el uso de animales.

Refinamiento

El ámbito de refinamiento afecta la vida del animal, el cual permite aliviar el dolor o malestar potencial o refinar los métodos empleados para mejorar su eficacia.^{21,22} Un primer aspecto a tener en cuenta es mejorar las condiciones de estabulación de los animales. Esto implica obtener y mantener animales libres de organismos patógenos mediante programas de cuarentena, medicina preventiva y control sanitario. También contribuye a mejorar las condiciones de estabulación, la existencia de procedimientos de cuidados adecuados a las necesidades de cada especie, disponer de sistemas de alojamiento óptimos, controlar las condiciones ambientales y cuando proceda, adoptar programas de enriquecimiento ambiental.²³ Otra oportunidad de refinamiento lo constituye garantizar el uso adecuado de anestésicos, mediante la selección del fármaco en función de la especie, tipo de dolor y al perfeccionar los métodos para detectarlo.²⁴ Se contribuye a reducir la angustia y el malestar de los animales con la utilización de aquellos procedimientos menos invasivos; por ejemplo, los relacionados con la observación interna (Resonancia Magnética Nuclear, Tomografía Axial Computarizada, estimulación eléctrica, etc.) o aplicando refinamiento a los invasivos.²⁵ Por último, debe seleccionarse siempre el método de eutanasia más apropiado en función de la especie, tamaño y características del ensayo, una vez terminado este en su lugar la eutanasia anticipada en caso de dolor o deterioro y definir puntos terminales en cada protocolo experimental.^{25,26}

Estas consideraciones no son solo importantes desde el punto de vista ético, sino también, para el buen desarrollo del experimento, ya que el dolor y el estrés dan lugar a cambios fisiológicos que pueden incrementar la variabilidad de los resultados experimentales.²⁷

Asociado a los aspectos expuestos en este apartado, es fundamental que las personas que manejen animales estén adecuadamente capacitadas para causarles el mínimo dolor o malestar por lo que este aspecto está contenido en regulaciones tales como la Directiva Europea 2011/63/EU.^{26,28}

Reducción

El concepto de reducción, dentro de los métodos alternativos, cubre toda estrategia que resulte de utilizar menor número de animales para obtener la misma cantidad de información, o bien, aumentar la información obtenida por animal y así potencialmente, limitar o evitar el consiguiente uso de animales adicionales. Según estadísticas, en los últimos años, se ha apreciado una reducción en el uso de animales de laboratorio en línea con la asociación entre reducción y calidad de los resultados científicos.²⁹⁻³¹

El primer paso para contribuir a la reducción es la evaluación exhaustiva y crítica de los datos existentes para, evitar duplicaciones de ensayos. En consecuencia, es necesario mejorar el almacenamiento, uso e intercambio de la información; lo que implica no solamente la existencia de bases de datos internacionales actualizadas, sino también, la aceptación legal de los resultados obtenidos en otros países para los mismos compuestos.³² Otro modo de contribuir a la reducción es la selección del modelo animal más idóneo, máxime cuando en la actualidad, se dispone de una gran variedad de cepas de ratones endocriados, mutantes, transgénicos, que dada su uniformidad genética pueden permitir que se utilice un número inferior de animales.^{33,34}

Se reduce el número de animales usados en experimentación cuando se emplean órganos o muestras de tejidos de animales sacrificados con otros fines (ensayos *ex vivo*) o cuando se utilizan implantes crónicos para la recopilación de datos. Esto último permite que los resultados se obtengan en condiciones muy cercanas a las fisiológicas y que los mismos animales permanezcan vivos durante periodos muy prolongados.³⁵

Aunque puede parecer una contradicción, cuando no se está muy familiarizado con el modelo experimental, puede ser muy útil realizar un ensayo piloto con un pequeño número de animales. Este ensayo proporcionará datos preliminares respecto al tamaño de los grupos, a los problemas de las dosificaciones y la logística general para poder llevar a cabo un diseño correcto del experimento; lo que contribuye fuertemente a la reducción del número de animales empleados.³⁶

Otro aspecto de la reducción lo constituye el diseño experimental de un proyecto de investigación empleando herramientas estadísticas. Estas permiten calcular el tamaño de los grupos experimentales según el grado de precisión de las medidas y realizar diseños de tipo factorial o secuencial. Los resultados de cada ensayo necesitan ser

interpretados y en muchos casos, el diseño del siguiente experimento depende de dicha interpretación. Errores a este nivel pueden ocasionar un consumo adicional de animales.^{37,38}

Contribuye también a la reducción, el abandono de ensayos que han demostrado ser irrelevantes, así como no solicitar la realización de un nuevo ensayo. No se solicitan nuevos ensayos cuando: la información existente sobre una sustancia desde el punto de vista toxicológico es reconocida como suficiente para propósitos de valoración de riesgo; los niveles de exposición humana están por debajo de lo que es considerado un riesgo importante para la salud; la información sobre una sustancia estructuralmente similar puede ser usada para satisfacer la brecha de conocimientos; hacer pruebas pudiera ser difícil, imposible, o en vano teniendo en cuenta la naturaleza de la sustancia en cuestión.³⁹

Aun cuando en la investigación toxicológica de productos farmacéuticos también se van aplicando técnicas *in vitro*, la mayor contribución en reducir animales de experimentación se ha hecho, en los programas de armonización internacional de protocolos. El hecho de que las autoridades regulatorias acuerden armonizar los protocolos de los ensayos que exigen, implica un gran avance en la reducción del consumo de animales de laboratorio.^{39,40}

Reemplazo

Se consideran métodos alternativos de reemplazo aquellos que permiten alcanzar el objetivo propuesto sin realizar ensayos u otros procedimientos experimentales con animales.⁴¹

Cada vez son más utilizados los sistemas *in silico*, los cuales se basan en modelos matemáticos o de simulación. Los sistemas *in silico* permiten relacionar computacionalmente estructura-actividad (SAR) y también cuantificar (QSAR). Estos modelos aprovechan correlaciones entre la estructura molecular y la actividad biológica de los respectivos productos, para predecir tanto actividades farmacológicas como efectos secundarios potenciales.⁴² Otros modelos pronostican tanto las propiedades biológicas como toxicológicas de una sustancia sobre la base de su estructura química y los conocimientos obtenidos de estructuras similares. Con el incremento de la sofisticación se han desarrollado modelos farmacocinéticos que hacen uso del conocimiento de las propiedades físico químicas del compuesto en cuestión así como de la anatomía y fisiología del organismo (como el volumen tisular, velocidad del flujo sanguíneo, transporte activo conocido, vías de biotransformación) para estimar la relación concentración/tiempo entre varios compartimentos y sistemas de órganos.⁴³ Las aplicaciones potenciales de estos modelos incluyen la predicción de la potencia y dosis óptimas del compuesto; también permiten la extrapolación del comportamiento biocinético de los compuestos químicos entre diferentes especies o rutas de exposición.^{44,45} De igual modo se crean modelos para el diseño molecular de fármacos de características definidas y específicas.⁴⁶⁻⁴⁸ Los modelos *in silico* han demostrado ser rápidos, baratos y reproducibles. Sin embargo, aún existen receptores o sistemas de enzimas poco conocidos, que median la toxicidad y conducen a la obtención de resultados falsos negativos.^{43,49}

Se habla también de reemplazo cuando se emplean especies inferiores en la escala filogenética; en especial, con un sistema nervioso menos sensible al dolor. Entre estas especies se encuentran los invertebrados, las plantas, las bacterias, los hongos, los protozoos y las algas. También se pueden utilizar embriones de vertebrados antes de que alcancen el punto a partir del cual su uso en experimentos está regulado. El uso de vertebrados en etapas tempranas del desarrollo al igual que microorganismos puede minimizar las preocupaciones éticas. Aunque no necesariamente en toda su amplitud, por ejemplo, no es clara la demarcación entre la sensibilidad de algunos vertebrados inferiores como los peces e invertebrados superiores como moluscos cefalópodos. Similarmente, la etapa de desarrollo a la que cada animal pasa del estatus desprotegido legislativamente al protegido raramente se basa en fuertes principios científicos.⁵⁰

Se consideran igualmente, alternativas al uso de animales los estudios en humanos, incluidos los realizados en voluntarios sanos, los epidemiológicos y de vigilancia farmacológica después de estar los productos en el mercado. Aunque la utilización de humanos como sujetos de pruebas plantea numerosas interrogantes de tipo ético, la información obtenida puede ser muy valiosa.^{51,52}

Otros métodos alternativos que sustituyen una cantidad ingente de animales son los métodos *in vitro*, los cuales engloban ensayos en cultivos celulares, tisulares, fracciones subcelulares, órganos perfundidos, en cultivo, reconstituidos o en cortes, explantes, reagregados celulares, cocultivos. En ellos utilizan células genéticamente modificadas, células transgénicas portadoras de genes humanos y muestras de procedencia humana. Estos métodos permiten que se controlen eficientemente las condiciones de ensayo, con lo que se alcanza un alto nivel de estandarización; además, son rápidos, económicos y requieren pequeñas cantidades del material de estudio. Sin embargo, aún cuando estos métodos presentan numerosas ventajas no debe dejar de considerarse que son muy restrictivos, ya que permiten evaluar solo un aspecto concreto de la toxicidad y no al organismo como un todo, por lo

que no pueden evaluarse las interacciones entre tejidos y órganos, ni los efectos sistémicos, la farmacocinética o los efectos crónicos.⁵³⁻⁵⁵

Parece poco probable que un modelo animal pueda ser reemplazado siempre por un único ensayo *in vitro*, por lo que se han desarrollado, evaluado y optimizado estrategias de investigación, organizándolas de un modo integral. Este nuevo enfoque en la evaluación de riesgo y seguridad comprende las estrategias de ensayo integradas (ITS sigla en inglés). Ellas incluyen la combinación de datos existentes, la agrupación por categorías químicas, ensayos *in vitro* y sistemas de cuantificación basados en modelos matemáticos. Sobre todo, la complejidad de la reproducción de los mamíferos requiere estrategias integradas de ensayo para satisfacer las necesidades relativas a la identificación del peligro y la evaluación del riesgo y así evitar la realización de ensayos que comprendan hasta dos generaciones de animales.^{34,56}

Más recientemente, se ha desarrollado el campo de la toxicogenómica, la cual es la aplicación del estudio de los genomas a la toxicología. La toxicogenómica permite detectar efectos tóxicos en días en comparación con años y a una fracción del costo del ensayo tradicional; por tanto, se pueden identificar efectos tóxicos tempranos a nivel molecular en situaciones *in vitro*, y pronosticar efectos que podrían ocurrir *in vivo*. Esta rama ha permitido aumentar la sensibilidad de los ensayos *in vitro*, lo que parece especialmente prometedor en el campo de la toxicología del desarrollo.^{57,58}

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

La ventaja principal de los métodos alternativos radica en las consideraciones éticas alrededor del uso de animales de experimentación. Aunque no se puede ni se debe generalizar, algunos métodos alternativos permiten ahorrar tiempo en la realización y en los costos. Sobre estas técnicas se puede ejercer un mejor control de las variables y así modificarlas de modo secuencial. En determinadas circunstancias, se puede aprovechar una mayor versatilidad en el diseño, posibilidad de poder utilizar células humanas y en algún tipo de estudio de nuevas moléculas. Puede ser de vital importancia, utilizar cantidades muy pequeñas de sustancias.^{2,5}

Otro aspecto positivo de los métodos alternativos es que pueden aportar información que no se podría conseguir en trabajos realizados *in vivo*. Mediante modelos *in vitro* se puede determinar con precisión el mecanismo de acción que induce un efecto farmacológico, tóxico o metabólico determinado. Se pueden medir eventos adversos causados por polimorfismo genético, lo que se denomina idiosincrasia metabólica, incluso crear modelos de simulación de situaciones no previstas.^{1,4,5}

No obstante algunas de las ventajas enumeradas anteriormente se convierten en limitaciones, pues se puede considerar que algunos modelos poseen un exceso de simplicidad, por lo que no permite evaluar reversibilidad. Se encuentran dificultades en poder realizar ensayos de larga duración, o estudios que requieran administraciones repetidas. Es igualmente complejo evaluar efectos secundarios provocados por interacciones entre distintos fármacos.

Otro aspecto limitante es la uniformidad de las respuestas. Asimismo, está el hecho de que no se obtienen efectos no buscados, siempre es el investigador el que ha de anticiparse a prever si tal efecto puede o no presentarse, y entonces diseñar el ensayo correspondiente. Por el contrario, cuando se trabaja con el animal aparecen con frecuencia efectos inesperados durante la realización de un ensayo que obligan a rediseñar o cambiar el modelo experimental para valorar estas actividades. En modelos animales, el organismo ejerce mecanismos reguladores y compensatorios de las distintas funciones, circunstancias que no son posibles en modelos más simplificados, lo que implica una mayor dificultad cuando se extrapolan resultados a partir de modelos como los *in vitro*.^{3,5}

MÉTODOS ALTERNATIVOS VALIDADOS Y ACEPTADOS POR OECD U OTRAS ENTIDADES REGULADORAS

Una vez que un método ha sido científicamente validado, entra en el proceso de aceptación regulatoria y adopción como directriz, lo que le confiere validez para su aplicación en estudios de valoración de riesgo. La aceptación regulatoria varía de un país a otro e incluso de una agencia regulatoria a otra dentro del mismo país; por lo tanto, la OECD fomenta la armonización de la aceptación regulatoria internacionalmente a través de la Guía para la Validación y Aceptación Internacional de Nuevos Ensayos o Ensayos Modificados para la Evaluación de Riesgo.¹⁵ Observar los principios definidos en las Directrices Generales de la OECD incrementa las probabilidades de adopción de métodos nuevos o modificados.^{4,5} En este sentido, un conjunto de muestra métodos alternativos han sido aceptados internacionalmente. (Tabla 1)

Tabla 1. Métodos Alternativos aceptados internacionalmente.

Método	Ensayo	Aceptación reguladora
Toxicidad aguda oral		
Método de las clases	<i>in vivo</i>	OECD TG 423 (2001)
Método de dosis fija	<i>in vivo</i>	OECD TG 420 (2001)
Procedimiento arriba-abajo	<i>in vivo</i>	OECD TG 425 (2006)
Ensayo de respuesta de queratinocitos normales humanos al rojo neutro (NHK NRU)	<i>in vitro</i>	OECD GD 129 (2010)
Ensayo de respuesta al rojo neutro Balb/c 3T3	<i>in vitro</i>	OECD GD 129 (2010)
Toxicidad aguda inhalación		
Método de las clases	<i>in vivo</i>	OECD (TG 436 2009, GD 153 (2011))
Penetración o absorción dermal		
Métodos <i>in vitro</i> para evaluar la absorción cutánea	<i>in vitro</i>	OECD (TG 428 (2004), GD 28 (2004), Notas no. 156)
Chequeo de mecanismos endocrinos		
Ensayo de activación transcripcional para agonistas de receptores (Rs) estrogénicos	<i>in vitro</i>	Actualizada OECD TG 455 (2012)
Esteroidogénesis (H295R línea celular humana)	<i>in vitro</i>	OECD TG 456
Método de transactivación del R estrogénico BG1Luc para identificar agonistas y antagonistas de los Rs estrogénicos	<i>in vitro</i>	OECD TG 457 (2012)
Corrosión ocular		
Ensayo de opacidad y permeabilidad córnea bovina	<i>ex vivo</i>	OECD (Revisado TG 437 (2012), GD 160)
Método del ojo aislado de pollo	<i>ex vivo</i>	OECD (Revisado TG 438 (2012), GD 160)
Liberación de fluoresceína	<i>in vitro</i>	OECD TG 460 (2012)
Evaluación del uso de anestésicos tópicos, analgésicos sistémicos y punto final en humanos	<i>in vivo</i>	Actualización OECD (TG 405 (2012), GD 19)
Estrategia de ensayo secuencial para irritación y corrosión ocular	<i>in vitro/ex vivo/in vivo</i>	Actualización OECD TG 405 (2012)
Irritación Ocular		
Uso rutinario de anestésicos tópicos, analgésicos sistémicos y punto final en humanos	<i>in vivo</i>	Actualización OECD TG 405 (2012), OECD GD no. 19
Estrategia Secuencial de ensayo para irritación y corrosión ocular	<i>in vitro/ex vivo/in vivo</i>	Actualización OECD TG 405 (2012)
Genotoxicidad		
Ensayo de Ames	<i>in vitro</i>	OECD TG 471 (1997)
Ensayo de mutagenicidad celular	<i>in vitro</i>	OECD TG 476 (1997)
Ensayo de aberraciones cromosómicas	<i>in vitro</i>	Actualización OECD TG 473 (2012)
Ensayo de micronúcleos en células de mamíferos	<i>in vitro</i>	Borrador OECD TG 487 (2012), ICH (2011)
Ensayo de intercambio de cromátidas hermanas	<i>in vitro</i>	OECD TG 479(1986)
Ensayo de síntesis no programada de ADN	<i>in vitro</i>	OECD TG 482(1986)
Ensayo de mutagenicidad en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>in vitro</i>	OECD TG 480(1986)
Inmunotoxicidad/Piel sensibilización		
Ensayo del nódulo linfático local	<i>in vivo</i>	Actualización OECD TG 429 (2010)
Nódulo Linfático Local LLNA: DA	<i>in vivo</i>	OECD TG 442A (2010)
Nódulo linfático local: BrdU-ELISA	<i>in vivo</i>	OECD TG 442B (2010)
Fototoxicidad		
Captación del rojo neutro células 3T3	<i>in vitro</i>	OECD TG 432 (2004)

ALTERNATIVAS Y 3Rs EN CUBA .

Con el objetivo de implementar la reglamentación sanitaria que garantice la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos se creó, en Cuba, el CECMED en 1989. Esta entidad es la encargada de velar por el cumplimiento de las directrices de buenas prácticas, entre las que se incluyen las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental (referida a laboratorios donde se realizan estudios farmacológicos, toxicológicos, ecotoxicológicos, etc.) .De modo que los laboratorios donde se realicen estos estudios, con la finalidad de presentar registros, deben estar certificados para las Buenas Prácticas de Laboratorio no clínico. Se garantiza así que cumplan con las normas éticas vigentes para la experimentación con animales, lo que se traduce en la aplicación de procedimientos que aseguran y documentan el seguimiento de los principios de las 3Rs en la práctica diaria. Los diseños experimentales de estos estudios deben realizarse siguiendo las normativas correspondientes al tema adoptadas por el CECMED o las normas de otros organismos reguladores, tales como la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), la organización internacional de estandarización (ISO) y la OECD. Siguiendo esta postura, en el caso de los métodos alternativos el CECMED acepta la presentación de los resultados empleando aquellos métodos que hayan sido aprobados por órganos reguladores internacionales (Tabla 1). Y a tales efectos exige que se conserve toda la información y los datos de la caracterización de los sistemas de ensayo, de tal forma que pueda realizarse la reconstrucción de los estudios y en los casos de sistemas de ensayo, que reemplacen animales de laboratorios, en tipos de estudios exigidos por las agencias reguladoras, se realizará además la validación completa del ensayo. Por otra parte, también exige que se describa el método de ensayo utilizado y se declare la referencia utilizada (OMS, ICH, OECD u otra). Promueve asimismo, el cumplimiento de criterios para asegurar la calidad e integridad de los estudios, realizados empleando métodos alternativos o no, el reporte de conclusiones verificables y la trazabilidad de los datos, aspectos relevantes para el reconocimiento y la aceptación de resultados.^{59,60,61}

Tabla 1. (Continuación de la página 17)

Método	Ensayo	Aceptación reguladora
Estudios de seguridad preclínicos para el desarrollo de drogas		
Guía para la conducción de pruebas clínicas en humanos	<i>in vivo</i>	ICH 2010
Evaluación de la seguridad preclínica de derivados farmacéuticos, ICH S6(R1)	<i>in vivo</i>	ICH (1997; actualización 2011)
Toxicología de la reproducción y el desarrollo		
Estudio de toxicidad reproductiva	<i>in vivo</i>	Actualización OECD TG 443 (2012)
Corrosión cutánea		
Resistencia eléctrica transcutánea en ratas TER	<i>ex vivo</i>	Borrador OECD TG 430(2012)
EST-1000 epidermis humana reconstruida	<i>in vitro</i>	
Modelo de piel humana EpiSkin®	<i>in vitro</i>	
Modelo de piel humana EpiDerm™	<i>in vitro</i>	Borrador OECD TG 431 (2012)
Modelo de piel humana SkinEthic™	<i>in vitro</i>	
Epidermis humana reconstruida Vitrolife-Skin™	<i>in vitro</i>	
Método de ensayo de barrera de membrana Corrositex®	<i>in vitro</i>	OECD TG 435(2006)
Irritación cutánea		
Ensayo de irritación cutánea EpiSkin® (con reducción de MTT)	<i>in vitro</i>	
Modelo EpiDerm™ SIT (EPI-200)	<i>in vitro</i>	Actualización TG 439 (2012)
Modelo SkinEthic RHE	<i>in vitro</i>	Documento no.137 (2010)

CONCLUSIONES

El desarrollo de la investigación biomédica unido al incremento de la conciencia en la reducción, reemplazo y refinamiento de los ensayos con animales ha estimulado la innovación en este campo. Sin embargo, la introducción de alternativas en ensayos estratégicos para la evaluación de la seguridad de medicamentos, no progresa rápidamente. Parte de esta situación se debe a problemas en la adecuada validación, pese a que las autoridades reguladoras han hecho un gran esfuerzo por armonizar sus requisitos en aras de impulsar el desarrollo de alternativas. Aun cuando, sociedades protectoras de animales y el público en general esperan el reemplazo total de los animales por modelos *in vitro*, a corto y mediano plazo la estrategia de desarrollo de métodos alternativos está más dirigida hacia la reducción y refinamiento de los métodos clásicos existentes, puesto que la complejidad del desarrollo de los mamíferos no puede reproducirse totalmente en ensayos de toxicidad *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Repetto G, Repetto M. Toxicología Avanzada. Capítulo 2, Métodos alternativos: estudios toxicológicos *in vitro*. En: Repetto M (ed) Madrid: Díaz de Santos;1995: 37-59.
2. Piersma A. Alternative Methods for Developmental Toxicity Testing. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. 2006; 98: 427-431.
3. Hartung T, Blaauw B, Leist M. Food for thought on education in alternative methods in toxicology. ALTEX. 2009; 26 (4):255-263.
4. Vinardell MP. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: Situación actual. Acta Bioethica. 2007;13 (1): 41-52.
5. Kandárová H, Letašiová S. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. Interdiscip Toxicol. 2011; 4(3): 107-113.
6. Rusche B. The 3Rs and animal welfare-conflict or the way forward? ALTEX. 2003; 20(Suppl1):63-76.
7. Alleva E, Scattoni ML. Introductory keynote. The state of the art in animal experimentation. Ann Ist Super Sanita. 2004;40(2):151-155.
8. Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma?. Gene Ther. 2004;11(Suppl 1):S64-66.
9. Amador MC, Morón FJ. Bioética en experimentación animal para validar usos de plantas medicinales en el Laboratorio Central de Farmacología. Rev Cubana Plant Med. 2010;15 (3): 1028-4796.
10. Quezada A. El animal como sujeto de experimentación. Aspectos técnicos y éticos.; Santiago de Chile Universidad de Chile: Andros Impresores: 2007: 228.
11. Riera L, Lugo S, Sosa I, Entrena A, Acevedo MC, Tabares T, *et al*. Programas de aseguramiento de la calidad en la producción de animales de laboratorio. Rev Salud Anim. 2008;30(1):12-16.
12. 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.
13. Balls M, Amcoff P, Bremer S, *et al*. The principles of weight of evidence validation of test methods and testing strategies. The report and recommendations of ECVAM workshop 58. ATLA. 2006;34:603-620.
14. Hartung T, Bremer S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Fortaner S *et al*. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. Altern Lab Anim. 2004;32:467-472.
15. OECD no. 34: 2005: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, Series on Testing and Assessment.
16. Hoffmann S, Edler L, Gardner I, *et al*. Points of reference in the validation process: the report and recommendations of ECVAM Workshop 66. ATLA. 2008; 36:343-352.
17. 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; 30:151-165.
18. 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.
19. Worth AP, Balls H. The Principles of Validation and the ECVAM Validation. Process. ATLA. 2004; 32 Suppl 1:623-629.
20. Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. Alternatives to Animal Experimentation. 2003; (Suppl 1) 20:3-61.
21. Hartley P, Lloyd M, Burton N Obstacles to the refinement of scientific procedures using living animals. Symposium 'Science in the Service of Animal Welfare' (Kirkwood JK, Roberts EA, Vickery S, eds). Edinburgh, 2-4 April 2003. Animal Welfare 13 suppl S 242.

22. Hawkins P, Felton LM, van Loo P, *et al.* Report of the 2005 RSPCA/UFAW Rodent Welfare Group meeting. *Lab Animal*.2006;35:1006-29.
23. Lloyd M H, Foden B W, Wolfenshon SE. Refinement: promoting the three Rs in practice *Laboratory Animals*. 2008; 42: 284-293.
24. Karas A .Barriers to assessment and treatment of pain in laboratory animals. *Laboratory Animals Europe*. 2006;6: 30-9
25. Hagelschuer I, Hauff P, Strube A, *et al.* Luminescent imaging technology as an opportunity to reduce and refine animal experiments: Light at the end of the tunnel? *ALTEX*.2009;26:177-185.
26. Kurosawa TM, Yakugaku Z. Alternatives to animal experimentation vs animal right terrorism. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2008. mayo 128 (5):741-6.
27. Ritskes-Hoitinga M, Gravesen L, Jegstrup I. Refinement Benefits Animal Welfare and Quality of Science. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. 2006; available at [Consultado el 1 de noviembre de 2013] available at: www.nc3rs.org.uk.
28. Wolfensohn S, Honess P. Laboratory animal, pet animal, farm animal, wild animal: which gets the best deal? *Animal Welfare*. 2004;16(Suppl.): 117-23.
29. Carlsson H-E, Hagelin J, Hau J. *The Veterinary Record*. 2004;154: 467-470.
30. Vinardell MP, Mitjans M. Alternativas al uso de animales en docencia. *Revista de Toxicología*. 2003; 20: 133
31. Spielmann H. Validation and Regulatory Acceptance of New Carcinogenicity Tests *toxicology pathology*. 2003; 31:154-59.
32. Arvidson KB. FDA toxicity databases and real-time data entry. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2008; 233: 17-19.
33. Kretlow A, Butzke D, Goetz ME, *et al.* Implementation and enforcement of the 3Rs principle in the field of transgenic animals used for scientific purposes. Report and recommendations of the BfR expert workshop, May 18-20, 2009, Berlin, Germany. *ALTEX*.2010; 27:117-134.
34. Kretlow, A., Butzke, D., Goetz, M e, *et al.* Implementation and enforcement of the 3Rs principle in the field of transgenic animals used for scientific purposes. Report and recommendations of the BfR expert workshop. Germany. 2010; *ALTEX*. 27 :117-134.
35. Balls M. Animal experimentation and the Three Rs: time for honest answers to some leading questions. *ATLA*: 2009; 37(3):229-32.
36. Hardy B, Douglas N, Helma C, *et al.* Collaborative development of predictive toxicology applications. *J Cheminform*. 2010; 2:7
37. Krewski D., Acosta D., Jr Andersen M, *et al.* Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J Toxicol. Environ. Health B Crit Rev*. 2010; 13: 51-138.
38. Van Ravenzwaay B. Initiatives to decrease redundancy in animal testing of pesticides. *ALTEX*. 2010;27:159-161.
39. Alternatives to Laboratory Animals. Reducing the Use of Experimental Animals Where No Replacement is Yet Available. En: Balls M, Festing MW, Vaughan S. *ATLA*.(2004) 32(Suppl 2): 1-104
40. Karapolat S. The use of animals in experimental studies. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2008;34:11.
41. Knight A. Non-animal methodologies within biomedical research and toxicity testing, *ALTEX*. 2008; 25(3):213-231.
42. Pedersen F, De Bruijn J, Munn SJ, Van Leeuwen K. Assessment of additional testing needs under REACH. Effects of (Q)SARs, risk based testing and voluntary industry initiatives. *Reprod Toxicol*. 2006; 17: 411-423.
43. Blaauboer BJ, Hermens J, Van Eijkeren J. Estimating acute toxicity based on in vitro cytotoxicity: role of biokinetic modelling. *ALTEX*. 2006; 23: 250-253.
44. Andersen ME. Physiological modelling of organic compounds. *Ann Occup Hyg*. 1991;35(3): 309-321.
45. Combes R, Grindon C, Cronin MT, Roberts DW and Garrod J. Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation. *Altern Lab Anim*. 2007;35 (2): 267-287.
46. Singh AV, Knudsen KB, Knudsen T. Computational systems analysis of developmental toxicity: design, development and implementation of a Birth Defects Systems Manager (BDSM). *Reprod Toxicol*. 2005;19: 421- 439.
47. Vedani A, Smiesko M, Spreafico M, *et al.* VirtualTox-Lab – *in silico* prediction of the toxic (endocrine-disrupting) potential of drugs, chemicals and natural products. Two years and 2,000 compounds of experience: a progress report. *ALTEX*. 2009; 26:167-176.

48. Blaauboer BJ, Hermens J and Van Eijkeren J . Estimating acute toxicity based on in-vitro cytotoxicity:role of biokineticmodelling, ALTEX. 2006;23(Special issue): 250-253.
49. Vedani A, Dobler M , Lill MA .Virtual test kits for predicting harmful effects triggered by drugs and chemicals mediated by specific proteins, ALTEX. 2005; 22(3): 123-134.
50. Balls M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. Altern Lab Anim. 1994;28:193-211.
51. Bhogal N and Combes R. TGN1412: time to change the paradigm for the testing of new pharmaceuticals. Altern Lab Anim. 2006;34:225-239.
52. Knight A Non-animal methodologies within biomedical research and toxicity testing. ALTEX.2008; 25(3):213-231.
53. Piersma, A.H, AS. Haakmat& A M. Hagenaaars: *In vitro* assays for the developmental toxicity of xenobiotic compounds using differentiating embryonal carcinoma cells in culture. Toxicol .InVitro. 1993: 7: 615-621. Publication: EUR 20863 [Consultado 27 de noviembre de 2013]En. <http://ecb.jrc.it/REACH/>
54. Repetto G, del Peso A, Salguero M, *et al.* Inventory of the spanish institutions and scientists involved in alternatives to the use of laboratory animals.Rev. toxicol.1999;16 (2): 49.
55. Murthy B. Relevance of *in vitro* toxicology studies in risk assessment,ALTEX. 2007; 24(3): 174-177.
56. Jaworska, J. and Hoffmann S. Integrated Testing Strategy (ITS) – Opportunities to better use existing data and guide future testing in toxicology. ALTEX. 2010; 27, 231-242.
57. Knight A, Bailey J, Balcombe J. Animal carcinogenicity studies: poor human predictivity Altern Lab Anim. 2006;34(1): 19-27.
58. Huggins J .Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance, ALTEX. 2003; 20(Suppl.1): 3-61.
59. Regulación 39/2004. Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental. Publicación 00-35,CECMED, 2005. [Consultado 4 de noviembre de 2013] Disponible en: www.cecmed.sld.su/pages/AmbReg-4.htm
60. CECMED, Requisitos para las solicitudes de Inscripción, renovación y modificación en el Registro de Medicamentos de uso Humano., Cuba, 2006.
61. Parlamento Europeo y del Consejo Directiva 2004/9/CE relativa a la inspección y verificación de las buenas prácticas de laboratorio (BPL).