

# MÉTODOS ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL EN LA EVALUACION DE LA SEGURIDAD

Guillermo Repetto\*, Ana del Peso, Jorge L Zurita

\*Coordinador del GTEMA- Grupo de Métodos Alternativos (<http://tox.umh.es/aetox/gtema/>). Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, y Area de Toxicología de la Universidad de Sevilla.  
Avda Dr Fedriani s/n; 41009 Sevilla. [repetto@us.es](mailto:repetto@us.es)

La Unión Europea parece decidida a acabar con la actual situación de **desconocimiento** sobre los riesgos reales que las sustancias y preparados químicos suponen para la salud humana y el medio ambiente. La legislación europea ha tratado desde 1967 de eliminar las barreras comerciales entre los países miembros mediante la implantación de un sistema común de clasificación y etiquetado.

A partir de 1981 se estableció un sistema de notificación de sustancias nuevas para garantizar el control de los productos comercializados. Aunque para las “nuevas sustancias” se exige una evaluación bastante completa, de las “existentes” o comercializadas antes de 1981 existe un absoluto desconocimiento sobre sus características toxicológicas.

## Métodos Experimentales Alternativos

1. Evitar la repetición innecesaria de experimentos *in vivo* e *in vitro*

2. Modelos Matemáticos de Predicción

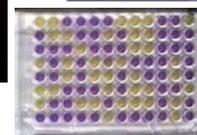
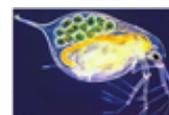
3. Mejor diseño de estudios animales

4. Organismos inferiores no protegidos

5. Embriones de Vertebrados

6. Métodos *In vitro*

7. Otros (Repetto, 1999)



En el Libro Blanco de la UE sobre la “Estrategia para la Futura Política en Materia de Sustancias y Preparados Químicos” se delinea un nuevo escenario unificado para el registro, evaluación o autorización de todas las sustancias usadas, que no incluye sólo la caracterización del peligro que suponen, sino también de los riesgos derivados de sus usos.

Para las **más de 30000 sustancias** producidas en cantidades superiores a 1 tm será necesario conocer urgentemente sus propiedades toxicológicas y ecotoxicológicas

antes de 2012. Para ello puede ser necesario utilizar más de 12 millones de animales vertebrados. Sin embargo, la nueva estrategia pretende fomentar los ensayos sin animales. De hecho, los ensayos de sustancias producidas entre 1 y 10 tm deberían limitarse a métodos *in vitro*. Nos encontramos por tanto en un momento crucial y una oportunidad para considerar la utilidad de los procedimientos que serán más necesarios, incluyendo los de toxicidad aguda, irritación, corrosividad, ecotoxicidad, etc.

La evaluación de la seguridad y eficacia de compuestos utilizados como plaguicidas, medicamentos, cosméticos, o compuestos industriales ha supuesto una de las grandes áreas de impulso de los métodos alternativos al empleo de animales en experimentación. Los métodos utilizados en experimentación, ensayo y enseñanza están en continuo progreso ya que los investigadores están en permanente búsqueda de posibles alternativas que mejoren la calidad de su trabajo. Ello es debido, en parte, a la lógica evolución de los conocimientos científicos y de sus aplicaciones tecnológicas, y en parte, a consideraciones éticas, logísticas, económicas, sociopolíticas y legales.

<b>Tabla 1. METODOS EXPERIMENTALES ALTERNATIVOS</b>
<b>1. Evitar la repetición innecesaria de experimentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>:</b>
Protocolos y estudios previos: Disponibilidad de la información, intercambio. Flexibilidad. Estrategias integradas
<b>2. Modelos Matemáticos de Predicción:</b>
Cinética ambiental de compuestos químicos Farmaco-toxicocinética (PB-PK) Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR)
<b>3. Mejoras en el diseño de estudios animales:</b>
Reducción: número de animales usados Refinamiento: minimización del dolor y distress; nuevos modelos
<b>4. Uso de organismos inferiores no protegidos:</b>
Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, animales invertebrados
<b>5. Vertebrados en etapas iniciales de desarrollo:</b>
Peces, anfibios, reptiles, pájaros, mamíferos
<b>6. Métodos <i>In vitro</i> :</b>
Organos: baños, perfusión, cultivo, cortes, órganos reconstituidos Explantos, reagregados celulares, micromasas, cocultivos Cultivo primario de células dispersadas Lineas celulares / transgénesis Sistemas libres de células
<b>7. Otros:</b>
Estudios en humanos: Voluntarios, epidemiológicos, vigilancia Modelos en la enseñanza y formación: Modelos mecánicos, sistemas audiovisuales, y simulaciones por ordenador y de realidad virtual
(Repetto, 1999)

## Validación y aceptación: ¿para qué fin?

La comunidad científica admite sin reservas la utilidad y los resultados obtenidos por diversos procedimientos *in vivo* e *in vitro* en la investigación básica o aplicada de los efectos farmacológicos, fisiológicos, de los mecanismos toxicodinámicos, de los procesos toxicocinéticos, etc.

*Sin embargo, para que los datos toxicológicos suministrados por un método experimental puedan ser utilizados para la evaluación del riesgo/peligro y el **registro** de un nuevo compuesto químico, medicamento, fitosanitario, etc, o para el **control medioambiental**, se requiere que su protocolo haya sido previamente **validado** científicamente y **aprobado** por las autoridades reguladoras.*

La **validación** es el proceso por el que se establece la reproducibilidad y relevancia de ese procedimiento para un determinado propósito. No se trata sólo de una comprobación intralaboratorio, sino de un largo proceso que incluye el ensayo de compuestos codificados en varios laboratorios para demostrar su utilidad, generalmente en comparación con otro ensayo en animales incluido en las normativas. La **aceptación** por las autoridades reguladoras de un nuevo procedimiento consiste en su aprobación e inclusión en las recomendaciones y normativas, tanto nacionales, como multinacionales (OCDE, UE), lo que le confiere validez para su aplicación en estudios de valoración del riesgo. En la progresión de nuevos ensayos desde su concepción hasta su aceptación reguladora pueden considerarse actualmente cinco fases: desarrollo del ensayo, prevalidación, validación, evaluación y progreso hacia su aceptación reguladora (Balls et al., 1995; Repetto, 1995).

*Para otros objetivos toxicológicos o no, diferentes de la valoración del riesgo, los métodos experimentales no han de seguir este proceso complicado y sobre todo lento de validación y aceptación reguladora, ya que pueden utilizarse las técnicas que sean consideradas útiles por quien los emplea.*

La gestión de los riesgos asociados al uso de las sustancias químicas industriales en la Unión Europea se basa en la Directiva 67/548 de la Comisión sobre clasificación embalaje y etiquetado de sustancias peligrosas, sobre la base de los peligros potenciales intrínsecos que la sustancia puede producir. Los métodos de ensayo estandarizados y legalmente válidos de la UE para determinar las propiedades intrínsecas de las sustancias químicas se publican en el Anexo V de la citada Directiva. La lista de procedimientos del Anexo V y la lista de las directrices de la **Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD)** coinciden aproximadamente en un 80 %.

En la Unión Europea, la coordinación del desarrollo de nuevos ensayos y la puesta al día de los existentes, corresponde a la Oficina Europea de los Productos Químicos (**European Chemicals Bureau, ECB**). Para impulsar el proceso de validación de nuevos procedimientos, la UE creó en 1991 el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (**ECVAM**), situado también en el Centro Común Europeo de Investigación en Ispra (Italia). El centro norteamericano de validación, denominado **Comité Coordinador Interagencias para la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM)** ha centrado su actividad en revisar los resultados de estudios de validación

patrocinados por otras instituciones, ya que el Programa Nacional de Toxicología no ha aportado fondos para la validación.

### **Métodos validados y aceptados**

La inminencia de la entrada en vigor de la prohibición de la experimentación animal en la evaluación de cosméticos ha tenido efectos estimulantes tanto en los científicos como en las empresas afectadas para intentar disponer de tecnologías alternativas. Así mismo, la Comisión Europea a través de sus programas y organismos, incluyendo el Centro para la Validación de Métodos Alternativos, ha promovido la realización de proyectos de desarrollo, optimización y validación de métodos. A pesar de que no fue posible cumplir los plazos iniciales, sí se han producido importantes avances en áreas relacionadas con la evaluación de productos, incluyendo la validación de procedimientos *in vitro* para evaluar la corrosividad, fototoxicidad o absorción percutánea. A continuación se citan algunos de ellos.

La OCDE ha sustituido el ensayo de la determinación de **la toxicidad aguda por vía oral** (DL50 según TG 401) por sus tres alternativas (420, 423 y 425). Estos ensayos reducen significativamente el número de animales empleados, y en muchos casos, el dolor y estrés asociado a los mismos. Tras el periodo de un año que comenzó en julio del 2001, la comunidad reguladora no debería utilizar más el ensayo de la DL50. La UE sigue aproximadamente el mismo calendario.

Existe un gran interés por conocer si es posible predecir la Dosis Letal por vía oral en Rata a través de métodos *in vitro*. Para ello, Halle y Gores (1988) prepararon una gran base de datos denominada como Registro de Citotoxicidad. En ella incluyeron 1912 concentraciones inhibitorias de sustancias seleccionadas de centenares de estudios *in vitro* y las DL50 de 347 compuestos. A partir de esto concluyen que es posible la predicción de la DL50 a partir de datos obtenidos *in vitro*, ya que la relación viene dada por la siguiente función:

$$\log (\text{DL50}) = 0.435 \times \log (\text{CI50x}) + 0.625 \quad \text{expresados en mmol}$$

En la actualidad se están llevando a cabo diversos estudios de validación para comprobar la utilidad de esta correlación, siendo los resultados preliminares muy esperanzadores. Por lo tanto es muy probable que en un futuro podrá estimarse con fiabilidad la DL50 con cultivos celulares, y que mientras tanto deberían usarse estudios *in vitro* al menos para seleccionar las dosis de inicio de los ensayos para determinar la DL50 *in vivo*.

Así mismo se ha considerado que el ensayo del nódulo linfático local (LLNA) en ratón está científicamente validado y debiera usarse para la evaluación de la capacidad de **sensibilización dérmica** en lugar del ensayo en cobayo, que es más doloroso y estresante, además de emplear más animales. Ha sido aceptado por 4 agencias norteamericanas (the Consumer Product Safety Commission, the Environmental Protection Agency, the Occupational Safety and Health Administration, Food and Drug Administration) como alternativa al ensayo en cobayo. ESAC/ECVAM también apoyó la preferencia del LLNA sobre el método en cobayo, que debería reservarse para casos especiales (2000).

En forma paralela la OECD (Actualización de la Directriz 406) y la EEC [1992], permiten el uso de métodos animales menos lesivos para detectar la capacidad sensibilizante sobre la piel. Para el ensayo de maximización pueden usarse 15 en vez de 30 cobayos, excepto en casos de duda. Como ensayo de criba puede usarse el método en ratón del LLNA (Kimber et al., 1991).

También se propone el empleo del ensayo en la Oreja del Ratón (MEST), la liberación de IgE en cultivos expuestos y la aplicación de parches dérmicos en humanos (CAN). Los procedimientos más prometedores *in vitro* son el cultivo de células dendríticas humanas a partir de mononucleares periféricos evaluando la liberación de IL-1 $\beta$  o la producción de sus ARNm, junto al empleo de modelos de piel humana reconstituida, cultivos de células de Langerhans, cultivos de queratinocitos y cocultivos de células T y células dendríticas.

ECVAM ha propuesto una estrategia para evaluar la capacidad de sensibilización dérmica (Worth y Balls, 2002) que comenzaría por la búsqueda de datos previos sobre el compuesto, seguida de la evaluación de las propiedades fisicoquímicas del mismo y la estimación mediante sistemas predictivos computacionales. A continuación se realizaría un estudio de los parámetros de partición, un ensayo *in vitro* de sensibilización, y finalmente, si no se han podido excluir los efectos, el ensayo de nódulo linfático local.

La Directriz 407 de la OCDE de estudio por dosis repetidas de 28 días fue revisada en 1995 para permitir su uso como primera etapa para detectar efectos inmunotóxicos (Barlow et al., 2002). Se incluyó la pesada del timo y el estudio histopatológico de las placas de Peyer, timo, nódulos linfáticos y médula ósea. Para una mejor evaluación se sugirió posteriormente realizar un estudio histopatológico especializado de las células y los órganos linfoides y linfáticos, y en caso de detectar alteraciones, aplicar un ensayo de eritrocitos de carnero. El estudio de 90 días, Directriz 408, puede ser más sensible, no sólo por el periodo de exposición, sino también por el empleo de mayor número de animales.

La EPA publicó en 1998 una directriz para detectar la supresión inmunitaria que investiga la respuesta de anticuerpos ante eritrocitos de carnero. Si el compuesto provoca inmunosupresión, se estudia la expresión de marcadores fenotípicos en sangre o células esplénicas. Si no se produce efecto, se aplica un ensayo funcional para células asesinas (NK-cells).

El National Institute of Public Health and Environment de los Países Bajos sugiere una aproximación en dos etapas (Barlow et al., 2002). En la primera se incluyen tests no funcionales como la cuantificación de IgM, IgG, Ig e IgE séricas, el análisis de subpoblaciones linfocitarias en bazo mediante citometría de flujo, y de las circulantes mediante sistemas de activación de fluorescencia celular (FACS), el estudio inmunohistoquímico y análisis morfométrico de los órganos linfoides.

En la segunda etapa se aplicarían tests funcionales de inmunidad humoral como el de aplicación *in vivo* durante 14-28 días de eritrocitos de carnero, que es muy sensible al requerir la cooperación celular, o bien los ensayos de actividad macrofágica, y de inmunidad celular en un ensayo de hipersensibilidad retardada, de la función NK, de la mitogénesis en la serie B o T, de resistencia a patógenos, etc. En muchos casos se estudian *in vitro* células expuestas *in vivo* o directamente *in vitro*.

Hasta el año 2000, solamente habían sido aceptados por las autoridades varios ensayos *in vitro*, concretamente tests de **genotoxicidad** disponibles desde los años 80, que

curiosamente no fueron sometidos a un proceso de evaluación científica tan riguroso y completo como el descrito. Afortunadamente en el año 2001 se aceptaron otros sistemas de varias áreas.

En la evaluación de la **capacidad fototóxica**, de gran interés para los compuestos aplicados sobre la piel, no existe un método *in vivo* validado ni aceptado, pero se ha aceptado recientemente un ensayo *in vitro* en cultivos de fibroblastos de la Línea celular de ratón, 3T3 NRU [OECD, UE (B.41), ICCVAM], que son expuestos a la sustancia ensayada e irradiados o no con luz ultravioleta, para a continuación comparar la captación del colorante vital rojo neutro. En el caso de sustancias fototóxicas se produce un incremento en la toxicidad en las células irradiadas debido a la activación por la luz de las mismas. Este fue el primer ensayo de toxicidad *in vitro* experimentalmente validado y aceptado para funciones reguladoras (Directiva 2000/33/CE de la Comisión de 25 de abril de 2000 por la que se adapta por 27ª vez al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE, Anexo V). Previamente ECVAM realizó un estudio de validación que demostró la validez del procedimiento con 20 sustancias. El estudio fue criticado por el Comité Científico en Cosmetología y Productos no Alimentarios de la UE porque no se habían incluido suficientes filtros solares. Se realizó un nuevo estudio que demostró la validez del método para los filtros solares, lo que fue también confirmado por ESAC.

En la evaluación de la **capacidad corrosiva sobre la piel**, 4 ensayos fueron sometidos por ECVAM a un estudio de prevalidación, y posteriormente a un estudio formal de validación utilizando 60 compuestos de ensayo en tres laboratorios diferentes (Fentem et al., 1998). Dos de los ensayos han sido considerados científicamente validados como alternativas para sustituir al ensayo de corrosividad en animales y están preparados para considerar su aceptación reguladora: el Ensayo de la Resistencia Eléctrica Transcutánea en Piel de rata o humana (TER) y el ensayo EPISKIN (modelo de piel humana reconstituida). El ensayo TER identifica correctamente corrosivos y no corrosivos, y el EPISKIN distingue además entre corrosivos y corrosivos severos. Para corrosividad dérmica, el ensayo de la *resistencia eléctrica transcutánea*, y el procedimiento de *piel humana reconstituida* fueron aceptados por la UE en 2000 (B.40).

Posteriormente el modelo EPISKIN dejó de estar disponible comercialmente, por lo que tras un estudio corto, el Comité Científico Asesor de ECVAM ha aprobado mediante una validación catch up la utilidad del modelo de piel humana Epiderm para distinguir entre compuestos corrosivos y no corrosivos de acuerdo con la UE y la OCDE (2000).

Por su parte, el Departamento de Transporte de Estados Unidos y el de Canadá aceptaron dos ensayos comerciales *in vitro* para clasificar las sustancias de acuerdo con su capacidad corrosiva según la reglamentación de las Naciones Unidas. El método alternativo CORROSITEX<sup>TM</sup>, aceptado en 1993, se basa en el tiempo que precisa un compuesto para destruir una biomembrana que separa dos compartimientos de un frasco, permitiendo el paso de un colorante de un compartimiento a otro. Suministra los resultados en 4 horas. \*El procedimiento SKIN<sup>2TM</sup> ZK 1350, aceptado en 1994, se fundamenta en la pérdida de viabilidad, determinada de acuerdo con la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), que sufre un cultivo análogo de piel humana a las 24 horas de una breve exposición a la sustancia.

Posteriormente varias agencias norteamericanas (The Environmental Protection Agency, the Occupational Safety and Health Administration, the Consumer Product Safety Commission) han aprobado el uso del ensayo *in vitro* Corrositex en USA como alternativa de reemplazo al ensayo con conejos. ESAC/ECVAM por su parte apoyó la medida pero indica los tipos de compuestos para los que no es válido.

También establecieron la UE y OECD (Actualización de la Directriz 404) un protocolo jerarquizado para detectar **corrosivos o irritantes severos sobre ojos y piel**. Tras considerar las propiedades fisicoquímicas, pH y el resultado de ensayos *in vitro* validados, los compuestos pueden ser clasificados directamente como irritantes severos sin llegar a ensayarse en animales. Sólo cuando no han resultado irritantes *in vitro* puede pasarse a su ensayo *in vivo*. En las directivas de la OECD no se definen cuales son los métodos validados, aunque la legislación en Gran Bretaña acepta ya el método de la medición de la resistencia eléctrica en epidermis aislada (TER). Algunos países aceptaron ensayos para la evaluación de la irritación ocular producida por cosméticos mediante el ensayo de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (HET-CAM).

La **absorción percutánea** se cuantifica con membranas dérmicas humanas o de rata en célula de difusión, estudiando la proporción de sustancia que las atraviesa. Este robusto procedimiento *in vitro* (OCDE TG 428) fue aceptado en 2002 tras numerosas controversias de índole político y a pesar de que no existía aún un procedimiento validado *in vivo* (TG 427).

Como procedimientos alternativos para evaluar la **embriotoxicidad**, el Centro Europeo para la validación de Métodos Alternativos ha validado científicamente (2001) tres ensayos:

- Un ensayo *in vitro* con células precursoras Embrionarias de ratón (EST), que permite distinguir entre compuestos moderados, fuertes y no embriotóxicos. No precisa de animales por lo que en la actualidad es la mejor opción.
- El Cultivo de Embrión Completo de rata (WEC), con la misma aplicación que el anterior, pero precisando usar roedores
- El ensayo de cultivo de células disociadas de encéfalo de embrión de rata en micromasas (MM), que identifica embriotóxicos potentes

Se están produciendo avances importantes en la predicción de la toxicidad aguda, tanto por revisión del procedimiento de arriba y abajo, como por el posible empleo de métodos *in vitro*. También se están realizando diversos programas de validación, como por ejemplo de evaluación de la toxicidad sobre el desarrollo y de disrupción endocrina.

### **Futuro ¿o presente de las alternativas?**

Como se ha comentado, la validación ha de hacerse para un determinado propósito. Ello implica que puedan existir ensayos cuya aceptación reguladora puede ser complicada, pero que son totalmente válidos y aceptables para la **toma de decisiones**. Muchos de estos procedimientos se emplean de forma rutinaria en la evaluación de medicamentos

aunque sólo los resultados de algunos de ellos se incluyen en los informes para el registro de los mismos. Entre ellos caben citar los nuevos modelos de sensibilización dérmica.

En un sentido más amplio, es necesario reconducir las estrategias actuales empleadas en la evaluación de la seguridad para flexibilizarlas, haciéndolas más efectivas.

La 52ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial aprobó el 7 de octubre de 2000 por unanimidad la 5ª revisión desde que fueron adoptados por primera vez en 1964 los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, es decir, la Declaración de Helsinki. En la línea de la propuesta efectuada en el 3º Congreso Mundial de Métodos Alternativos, ya no se exige realizar siempre ensayos con animales previamente a los humanos. En concreto, el Artículo 11 queda redactado así:

*“La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados, y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno”. Por lo tanto, los procedimientos alternativos pueden proporcionar un considerable ahorro en el número de animales empleados.*

Los cambios propuestos en el Libro Blanco sobre la Estrategia para la Futura Política en Materia de Sustancias y Preparados Químicos suponen en la práctica la necesidad de disponer de métodos de ensayo **más eficaces** que los actuales y que presenten menos requerimientos logísticos. Ello supone una excelente oportunidad para la inclusión de nuevos métodos *in vitro* para la evaluación de la seguridad en las normativas, una vez que han sido aceptados varios de ellos.

## Bibliografía

- Balls M, Blaauboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B, Fielder RJ, Guillouzo A, Lewis RW, Lowel DP, Reinhardt CA, Repetto G, Sladowski D, Spielman H, Zucco F (1995) . Practical aspects of the validation of toxicity tests procedures. The report and recommendations of ECVAM Workshop 5. Alternatives To Laboratory Animals 23, 129-147,
- GTEMA (2004) Boletines 22-29 del Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos <http://tox.umh.es/aetox/Grupos/gtema/>
- OCDE (2001). Guidance Document N° 34 on Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Internacionalmente Aceptable Test Methods in Hazard Assessment. Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
- de la Peña de Torres E., Guadaño Larrauri, A. y Repetto Kuhn, G. (1998). Métodos Alternativos y complementarios en Experimentación Animal. En Introducción a la Experimentación y Protección Animal, Perez García CC, Diez Prieto MI, García Partida, Universidad de León, León, 159-167.
- Repetto G y Repetto M. (1995) Métodos Alternativos: Estudios Toxicológicos *in Vitro*. Capítulo 2. En, Toxicología Avanzada. M Repetto (Ed). Díaz de Santos. Barcelona, 37-59.
- Repetto G, del Peso A, Salguero M, Repetto M (1999) Inventory of the Spanish Institutions and Scientists Involved in Alternatives to the use of Laboratory Animals (Refinement, Reduction or Replacement) Revista de Toxicología 16: 50-127 (<http://tox.umh.es/aetox/Grupos/gtema/GTEMA9.html>)
- Spielman H, Liebisch M (2001) Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. Toxicology in vitro 15: 585-590
- UE Comisión Europea (2001) Libro Blanco sobre la Estrategia para la Futura Política en Materia de Sustancias y Preparados Químicos. <http://www.europa.eu.int/comm/environment/chemicals/whitepaper.htm>
- Worth AP, Balls M (2002) Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects ATLA 30 Supp 1 <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

## Enlaces de Internet

- ALTIB: Bibliografía sobre alternativas. <http://toxnet.nlm.nih.gov/altbib.html>
- ALTWEB: Web de alternativas. <http://altweb.jhsph.edu/about-us/search.htm>

- ECVAM: Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos. <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- GTEMA Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos <http://tox.umh.es/aetox/Grupos/gtema/>
- ICCVAM: Centro norteamericano para la Validación de Métodos Alternativas <http://iccvam.niehs.nih.gov/home.htm>
- INVITTOX: Protocolos de experimentación in vitro. <http://www.invittox.com/>
- Refinamiento: [http://www.awionline.org/lab\\_animals/biblio/laball.htm](http://www.awionline.org/lab_animals/biblio/laball.htm)
- REMA: Red Española de Métodos Alternativos. <http://www.remanet.net>