RESEÑA ANALÍTICA

Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados

Rafael Gámez y Rosa Más.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 e/ 19 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de la Habana. Teléfono: 2714225, Correo electrónico: cpn@cnic.edu.cu

Recibido: 24 de agosto de 2006. Aceptado: 6 de febrero de 2007.

Palabras clave: Toxicología aguda, Toxicología dosis repetidas, citotoxicidad, genotoxicidad, teratogénesis, carcinogénesis.
Key words: Acute toxicology, doses repeated toxicology, cytotoxicity, genotoxicity, teratogenesis, carcinogenesis.

RESUMEN. El desarrollo de nuevos medicamentos impone la necesidad de evaluar su potencial tóxico en modelos experimentales. Esto es posible a través de la realización de un conjunto de estudios toxicológicos en diferentes especies de animales que permiten identificar la toxicidad intrínseca, así como los órganos y tejidos diana de la toxicidad relacionada con el compuesto en evaluación. El tipo y diseño de estos estudios estará en dependencia de las características y destino final del producto, pero en la generalidad de los casos, el objetivo debe ser la demostración de las potencialidades tóxicas por administración única (toxicología aguda), administraciones repetidas (subcrónica y crónica) y estudios especiales de genotoxicidad, toxicología de la reproducción y la fertilidad, llegando incluso en muchos casos a ser necesario la evaluación de su potencial carcinogénico. Esta evaluación constituye un aspecto esencial de la valoración de la razón riesgo/beneficio que la entidad reguladora de medicamentos tiene en cuenta antes de autorizar el desarrollo de estudios clínicos en humanos, y posteriormente para la aprobación de su uso en el mercado, en función de la indicación propuesta. En general, solo la interpretación de los resultados de los estudios realizados, en armónica integración, permite llegar a conclusiones más abarcadoras sobre el potencial tóxico de la sustancia evaluada. Con el presente trabajo se pretende detallar los aspectos más importantes de los estudios más utilizados en la batería de ensayos toxicológicos preclínicos exigidos por las Entidades Reguladoras de Medicamentos.

ABSTRACT. The evaluation of new drugs involves the evaluation of the toxicity associated with their use in experimental models. In that way, preclinical toxicological studies in different animal models are necessary for the preliminary determination of intrinsic toxicity and target organs and tissues. The design of these studies depends on characteristics and proposed use for the product under research, but the objective must be the demonstration of the toxicity after single (acute toxicity) and repeated administration (subchronical and chronical administration) and special studies of genotoxicity, developmental and fertility toxicity and carcinogenicity. This evaluation is important for Regulatory Authorities who must consider benefits/risks ratio in order to approve clinical studies and/or the use of a new drug. Taking into account this background some preclinical toxicological studies are established as obligatory and its integral interpretation contributes to avoid erroneous conclusions about the potential risk of the compound researched. The aim of this work is to describe the most important aspects related to the conduction of these studies.

INTRODUCCION

En la evaluación toxicológica de nuevas sustancias se emplean baterías de ensayos en diferentes especies animales, que comprenden modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Las mismas abarcan diferentes dianas de toxicidad, que van desde la toxicidad intrínseca de la sustancia evaluada en los ensayos de toxicidad aguda, hasta la evaluación de sus posibles efectos tóxicos en los diferentes sistemas y órganos mediante la conducción de ensayos denominados de toxicología especial, como son los estudios de genotoxicidad, de teratogénesis y carcinogénesis.¹⁻⁷ La valoración armónica de los resultados de estos estudios permite llegar a un criterio más integral de la toxicidad de la sustancia evaluada y sus posibles consecuencias para el ser humano.

Con el objetivo de garantizar la adecuada conducción e interpretación de los estudios toxicológicos y armonizar internacionalmente los requisitos de registro sanitario, se han desarrollado Conferencias Internacionales de Armonización (ICH), donde se han definido criterios para ser considerados en el diseño de los diferentes estudios toxicológicos, con base en la evidencia aportada por años de investigación en el campo de la toxicología, de forma tal que se garanticen resultados confiables y reproducibles.¹⁻⁴

Desde la pasada década, como resultado de los avances científicos y por razones éticas y prácticas, se han introducido cada vez más los denominados métodos alternativos

en la evaluación toxicológica, con el objetivo de reducir el número de animales empleados en cada ensayo y refinar procedimientos existentes para disminuir el estrés y el sufrimiento de los mismos.^{5, 8, 9}

El animal de experimentación constituye la unidad experimental en los estudios toxicológicos *in vivo*, y su empleo está regido por regulaciones con vistas a un adecuado uso, según los requerimientos del estudio y tomando en cuenta principios éticos.⁹⁻¹²

El empleo de animales de experimentación ha de estar respaldado por un protocolo de ensayo, que debe confeccionarse cumplimentando las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) no clínicas¹³ y los protocolos específicos del estudio.

La selección de los diferentes ensayos toxicológicos a emplear, especies, tiempo y vía de exposición, así como de los niveles de dosis a emplear en los mismos, estarán en dependencia de las características propias de la sustancia a ensayar, así como de los objetivos de su posible uso en humanos.

En el presente trabajo se relacionan los ensayos toxicológicos más comúnmente empleados en la evaluación del potencial tóxico de los nuevos medicamentos, y sus características más distintivas. Estos ensayos constituyen la base de los estudios exigidos por las entidades reguladoras.^{6, 7, 14}

ESTUDIOS DE DOSIS UNICAS

El estudio de la toxicidad aguda evalúa la toxicidad inducida por la droga sujeta a estudio como resultado de la administración de altas dosis, ya sea por la administración única o repetida en un intervalo no mayor de 24 horas,^{15,16} brindando información sobre la toxicidad intrínseca del producto y el posible riesgo que conlleva su exposición aguda. Además, aporta valiosa información para la selección de los niveles de dosis a emplear en los estudios subcrónicos.¹⁵

Durante muchos años, la toxicología aguda era sinónimo de búsqueda de la dosis letal media (DL_{50}), la cual causa la muerte del 50 % de los animales. Este método dejó de ser requisito para el registro de medicamentos a finales del 2002, siendo reemplazado por tres métodos alternativos: *Método de la Dosis Fijada*, *Método de las Clases de Toxicidad Aguda* y *Método Arriba y Abajo*. Los dos primeros son producto de iniciativas europeas, y el tercero es

fruto de una iniciativa americana.¹⁵ A partir de entonces, los países que integran la OECD no aceptan los estudios agudos clásicos como parte de la documentación para el registro de medicamentos. En Cuba su empleo no está oficialmente derogado, aunque no constituye un requisito indispensable presentar la DL_{50} . Es suficiente demostrar que las dosis empleadas son lo adecuadamente altas con relación a la dosis mínima con actividad farmacológica en esa especie,⁷ siendo la letalidad sólo uno de los indicadores de la toxicidad aguda de la sustancia que se evalúa, conjuntamente con los efectos tóxicos observados y su momento de aparición. La letalidad permite establecer la dosis con la cual se observa "toxicidad evidente", así como definir la curva dosis-efecto.^{15,16}

La selección de los niveles de dosis ha sufrido variaciones con la introducción de estos nuevos métodos. La dosis de 5 000 mg/kg, nivel aceptado durante muchos años como dosis máxima, desde diciembre de 2001 se ha reducido a 2 000 mg/kg en el Método de las Clases, el Test Límite y el Método Arriba y Abajo, aunque sigue siendo la dosis máxima de elección en el Método de la Dosis Fijada.^{15,16}

La concepción actual tuvo su origen en el esfuerzo que la comunidad científica ha realizado en aras de reducir y optimizar el uso de las especies animales, y porque rara vez los estudios de toxicidad por dosis únicas reflejan problemas que no emanen de la toxicidad intrínseca de la sustancia.

ESTUDIOS DE DOSIS REPETIDAS

El tiempo de duración mínima de los estudios de toxicidad de administración continuada se define, dentro de los requisitos para el registro de medicamentos de nuestro país,⁷ en función de la duración del tratamiento a emplear en humanos para el producto en cuestión. Sin embargo, en la práctica generalmente se aplican diseños establecidos y armonizados, en los cuales la información de los estudios precedentes constituye la información básica necesaria para el diseño del nuevo estudio, fundamentalmente en cuanto a la selección de la dosis y el refinamiento de las observaciones y determinaciones sobre órganos diana en particular. De este modo, a los resultados de los estudios de dosis única le sigue la realización de estudios de administración con-

tinuada, con diseños subagudos, subcrónicos y crónicos.

Estudios Subagudos

Los estudios subagudos se definen como los efectos tóxicos que se manifiestan tras la administración repetida de una sustancia durante un corto período de tiempo, generalmente entre 14 y 30 d. Este ensayo tiene como objetivo obtener información para la selección de los niveles de dosis que serán empleados en los estudios subcrónicos y crónicos, así como la identificación de los efectos tóxicos que pudieran aparecer bajo estas condiciones de experimentación.^{17, 18}

Estudios Subcrónicos

La toxicidad subcrónica, se define como los efectos adversos por toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o sus metabolitos, los cuales ocurren por la administración del agente durante un período de tiempo que representa, aproximadamente, el 10 % de la vida del animal. Esto propicia la detección de los efectos aditivos debido a la administración del producto, y permite definir la máxima dosis con la que no se aprecia toxicidad relacionada con la droga (NOEL), así como la dosis máxima tolerada (DMT).¹⁷⁻¹⁹

El estudio subcrónico no es capaz de detectar aquellos efectos que se manifiestan tras un mayor período de latencia; sin embargo, brinda una valiosa información sobre los órganos dianas, y constituye la base para la selección de los niveles de dosis a evaluar en los estudios crónicos.

Estudios Crónicos

Los ensayos crónicos se realizan con el objetivo de determinar potencial toxicológico de la sustancia luego de una prolongada y repetida administración. El tiempo de administración varía para especies roedoras y no roedoras. Así, en roedores es entre 6 y 12 meses, y en no roedores de 9 y 12 meses, períodos suficientes como para que se manifieste el efecto tóxico de una sustancia por su uso crónico.¹⁷⁻¹⁹

El ensayo debe ser realizado en al menos dos especies: una roedora, preferiblemente en ratas (al menos 20 animales/sexo/grupo); y una no roedora, siendo los perros (al menos 4 animales/sexo/grupo) una de las más empleadas. El empleo de otras especies en estudios crónicos es poco frecuente, y ha de realizarse teniendo en cuenta argumentos sólidos que

demuestren la necesidad del empleo de la misma.

Su diseño se encamina a detectar los efectos tóxicos generales, incluidos los neurológicos, fisiológicos, bioquímicos, conductuales y patológicos, como resultado de la prolongada acción y la incrementada concentración de la sustancia administrada o sus metabolitos. En estos estudios es conveniente poder determinar la relación dosis respuesta y NOEL; los niveles de dosis a utilizar se seleccionan de acuerdo a toda la información fármaco-toxicológica precedente, y ésta se analiza como un todo durante el diseño experimental, debido a lo costoso que resulta este tipo de ensayo.¹⁷⁻¹⁹

La máxima dosis a emplear, la cual no debe exceder 1 000 mg/kg de peso corporal por día, debe inducir signos de toxicidad sin que ponga en peligro la supervivencia de los animales, para lo cual es necesario basarse en los hallazgos indicativos de toxicidad del estudio subcrónico precedente. Por su parte, la dosis menor no debe inducir evidencias de toxicidad, mientras que en la dosis intermedia se debe manifestar una disminución de los síntomas y signos indicativos de toxicidad observados en la dosis mayor.

TOXICOLOGIA ESPECIAL

Estudios de citotoxicidad en líneas celulares

Dentro del tamizaje toxicológico inicial de los productos, también pueden ser incluidos los ensayos *in vitro* que permitan detectar alteraciones de las funciones celulares básicas, debido a la exposición a un compuesto prueba que conlleve un daño celular. Estos ensayos emplean como modelos experimentales microorganismos, células y órganos aislados, cultivos primarios y líneas celulares.²⁰

Entre las pruebas de citotoxicidad más utilizadas para estos fines se encuentran: el ensayo de captación del rojo neutro, el ensayo de enlazamiento al azul de kenacid, y el ensayo de reducción del bromuro de dimetil-difenil-tetrazólico (MTT).²¹⁻²³

Estos ensayos utilizan la viabilidad celular como un índice de toxicidad celular. De manera general, se basan en que un compuesto citotóxico debe afectar al menos uno o más procesos implicados en la proliferación celular, como son: la síntesis del ADN, el funcionamiento de los organelos, la integridad de la membrana celular o la síntesis de

las proteínas. Estas afectaciones conllevan a una disminución del crecimiento de las células, lo que puede ser cuantificado emitiendo un criterio de viabilidad celular.

Estudios genotoxicológicos

El ensayo de incorporación en placa con *Salmonella typhimurium* o Test de Ames,²⁴ es el más comúnmente usado para el tamizaje de nuevas sustancias, por su capacidad de detección de agentes genotóxicos que producen mutaciones en el genoma por sustitución de bases o corrimiento del marco de lectura. Las cepas, manipuladas genéticamente para aumentar su sensibilidad, tienen como rasgo más significativo la auxotrofia para los aminoácidos histidina (His) y biotina (Bio). Al inducirse una mutación en este locus, la cepa reierte hacia la prototrofia y es capaz de crecer en un medio carente de His y Bio. De esta forma, se posibilita cuantificar por el número de colonias revertantes el nivel de mutación inducida por la sustancia a evaluar, en comparación con lo expresado en los controles. A las distintas cepas se les han realizado otras modificaciones genéticas con el objetivo de incrementar la sensibilidad, de modo tal que se puedan detectar con mayor facilidad los mutágenos.^{24,25}

La prueba de micronúcleos (MN) en médula ósea es quizás el test de genotoxicidad *in vivo* más empleado, por ser un sistema simple y reproducible para determinar daño cromosómico, a la vez que brinda clara información sobre la proliferación celular en médula ósea.^{25,26}

Los MN son el resultado de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedan atrapados dentro de membranas nucleares, fácilmente distinguibles con tinsión de giensa o empleando técnicas mas complejas, como es el uso de antígenos marcadores de centrómero, o con técnicas de fluorescencia por hibridación *in situ*, las cuales permiten discernir si el compuesto indujo un evento clastogénico o aneugénico, determinado por la presencia o no de centrómeros en los micronúcleos.²⁷

El hecho que los eventos que originan incremento de la frecuencia de MN han sido correlacionados con la formación de tumores, hacen de este ensayo un potente instrumento en el tamizaje de agentes genotóxicos, con la ventaja de ser aplicable *in vivo* a grandes poblaciones.²⁷

El ensayo de la morfología del espermatozoide en ratones, em-

pleado como indicador de mutación en las células germinales, parte de la premisa de que un agente que induce formas anormales interfiere el proceso normal de diferenciación de las células germinales, existiendo evidencias experimentales que avalan su empleo como posible indicador de daño genotóxico, teniendo en cuenta la capacidad de muchos mutágenos de alterar la morfología del espermatozoide.²⁸

Defectos en la morfología del espermatozoide han sido correlacionados con anormalidades metabólicas, funcionales y estructurales en la descendencia.²⁸ Este ensayo generalmente se incluye dentro de los estudios subcrónicos y crónicos, facilitando un uso más óptimo de los animales de experimentación.

El ensayo de Electroforesis Alcalina en Células Individuales (Ensayo Cometa), permite detectar el daño al ADN en células individuales, detectando las rupturas de cadena y sitios lábiles al álcali en el ADN, al cuantificar la migración del ADN.^{29,30}

Conocido como ensayo cometa por el patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas en este ensayo, este test deviene en un método de interés en los estudios de genética toxicológica, por su alto potencial de detección de daño al ADN, específicamente aquellos producidos por las rupturas de cadena, la formación de sitios lábiles al álcali, y los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas en células eucariotas obtenidas tanto de estudios *in vivo* como *in vitro*.^{29,30}

Toxicología de la fertilidad y la reproducción

Estos estudios han de realizarse de forma obligatoria para todo nuevo medicamento que pueda ser empleado en pacientes en edad reproductiva,^{7,31} y han de evaluar el efecto de la sustancia ensayo sobre la fertilidad, su potencial Teratogénico y su efecto peri-postnatal.

Cada uno de los estadios del desarrollo embrional posee una vulnerabilidad característica compleja y variada. Una etapa especialmente sensible es la organogénesis, caracterizada por transformaciones muy rápidas en el embrión, siendo de gran importancia en este momento para la diferenciación de los órganos.

El daño durante la organogénesis puede conducir a defectos estructurales de nacimiento, em-

brioletalidad, o reparación del daño, siendo conocidos los compuestos responsables de inducir malformaciones fetales como agentes teratogénicos, que producen sus efectos embriotóxicos dentro de un rango de dosificación no tóxico para la madre.³²

En la actualidad, en la guía de detección de la toxicidad de la reproducción asociada a productos medicinales se subdivide la Toxicología de la Reproducción en tres segmentos: fertilidad y desarrollo embrionario temprano, desarrollo embrio-fetal, y desarrollo prenatal y postnatal, incluyendo la función materna.³²

La evaluación del potencial teratogénico de las drogas en desarrollo, es uno de los objetivos recogidos en esta guía. La teratogénesis evalúa la toxicidad del desarrollo embrionofetal y se realiza generalmente en dos especies: ratas y conejos, para lo cual el producto es administrado al animal preñado durante el período de la organogénesis.

El período embrionario, durante el cual ocurre la organogénesis, tiene lugar desde la tercera a la octava semanas en humanos y desde el sexto al decimoquinto días de gestación en los roedores.^{32,33} Durante este período de tiempo las transformaciones que ocurren en el embrión son muy rápidas, siendo de gran importancia la diferenciación de órganos.

Carcinogénesis

Los estudios de carcinogénesis tienen por objeto determinar si la sustancia ensayo tiene un efecto promotor de tumores, ya sea por afectar factores de crecimiento, o activar oncogenes como resultado de una prolongada acción e incremento de la concentración de la sustancia o sus metabolitos en tejidos susceptibles. Esto se traduce en la aparición temprana de lesiones neoplásicas (aumentando así la morbimortalidad), en el incremento de la frecuencia de aparición de un tipo determinado de lesión tumoral, o por inducir la aparición de lesiones raras, no comunes en el modelo animal empleado.

Este ensayo es necesario acometerlo, fundamentalmente, para aquellos medicamentos que serán empleados en humanos en tratamientos crónicos, empleando en su evaluación la misma vía de administración que en la práctica médica.

La carcinogenicidad en modelos animales se realiza por ensayos convencionales, empleando animales

modificados genéticamente o modelos que estudian diferentes etapas o mecanismos críticos en el desarrollo de lesiones neoplásicas. El ensayo más ampliamente empleado es el tratamiento crónico en roedores, con una duración de 24 meses en ratas y 18 meses en ratones.^{17,18,34-35}

Ratas y ratones son las especies de elección por su relativamente corto período de vida; por su uso frecuente en estudios toxicológicos y farmacológicos, lo que brinda una valiosa información sobre su fisiología; por su susceptibilidad a la inducción de tumores, y a la vez, por contar en numerosas bases de datos con información sobre frecuencia de aparición espontánea de diferentes tipos de tumores. Esta información detallada se encuentra caracterizada por las diferentes líneas de ratas y ratones, siendo las más empleadas aquellas que presentan una menor frecuencia de lesiones neoplásicas espontáneas. Así, las líneas de ratas más empleadas en estudios carcinogénicos de largo término son la Fischer y la Sprague Dawley; mientras los ratones B6C3F1, CD-1 y OF-1 son los más empleados atendiendo a las mismas razones.³⁵

El estudio del potencial carcinogénico de una sustancia ha de permitir clasificarlo en una de las siguientes categorías:

Evidencia suficiente de carcinogenicidad: Incremento de la frecuencia de tumores malignos, o la combinación de malignos y benignos en al menos dos especies, o al menos en dos estudios independientes en la misma especie. Si la frecuencia de lesiones malignas es elevada y no es común el tipo de tumor, el tejido afectado y el momento de aparición, solamente un estudio y hallazgos en un solo sexo son evidencia suficiente.

Limitada evidencia de carcinogenicidad: Los resultados sugieren efecto carcinogénico, pero ha sido observado en un solo ensayo, o se incrementa tan solo la frecuencia de lesiones neoplásicas benignas.

Inadecuada evidencia de carcinogenicidad: Insuficiente información o resultados contradictorios.

Ausencia de carcinogenicidad: La evidencia sugiere ausencia de carcinogenicidad en roedores si se obtienen resultados negativos en dos especies.

Dentro de los factores que pueden inducir la aparición de lesiones neoplásicas, está el factor especie-línea, la edad, el tipo de alimentación y la cantidad de alimentos consu-

mida, y aquellos propiamente relacionados con la sustancia ensayo, la dosis, o la ruta de administración duración del tratamiento.

CONCLUSIONES

Los estudios toxicológicos preclínicos deben ofrecer la mayor evidencia experimental posible, esclarecer órganos diana, definir los niveles de exposición a partir de los cuales aparecen efectos tóxicos, o establecer el mayor nivel de dosis al cual no se producen efectos adversos, con el objetivo de extrapolar los resultados al ser humano, teniendo en cuenta las diferencias cualitativas y cuantitativas entre especies, así como la imposibilidad de detectar ciertas formas de toxicidad, como las relacionadas con reacciones alérgicas e idiosincráticas.

Por lo general, se reconoce que la extrapolación de los efectos de las sustancias ingeridas por vía oral se basan en la dosis determinada como NOEL (mg/kg de peso corporal), dividida por un factor de 100, determinado al asumir un factor de seguridad de 10 con relación a la extrapolación entre especies (animales-hombre), y otro factor de 10 asumiendo la variabilidad interindividual en los humanos.

Sin embargo, no siempre los estudios toxicológicos permiten establecer un claro margen de seguridad del producto en estudio, lo cual no implica se pueda iniciar su evaluación en ensayos clínico controlados, comenzando por los de fase I, los cuales fueron diseñados específicamente para conocer de la seguridad y tolerabilidad en voluntarios sanos. En muchos casos, la manifestación de efectos adversos solo se hace evidente en estudios de farmacovigilancia post-comercialización, en los cuales se han revelado lamentables evidencias del riesgo real del uso en humanos de determinados medicamentos.

Una evaluación toxicológica integral, donde tanto los métodos de experimentación animal más convencionales y bien conocidos como los nuevos métodos alternativos permanezcan en armónica integración, permitirá ofrecer un mayor y más confiable margen de seguridad para reducir al mínimo el riesgo potencial y con la mayor certeza posible.

BIBLIOGRAFIA

1. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Note for guidance

- on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies. **Drug Inf. J.**, step 4, 1994.
2. International Conference on Harmonisation: Guideline on detection of toxicity to reproduction for medical products. Fed Reg. 59, 1995.
 3. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals. **Drug Inf. J.**, step 4, 1995.
 4. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. **Drug Inf. J.**, step 4, 1996.
 5. Garthoff B. Alternative testing in drug research and development. Validation issue. **Toxicology in Vitro**, 9, 789-93, 1995.
 6. Ramirez D. Update in Pre-Clinical Regulatory Requirements for Phytomedicines in Latin America. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 3, No.1, Article 3.
 7. Requisitos para las solicitudes de Inscripción, Renovación y Modificación en el Registro de Medicamentos de uso Humano. CECMED, Cuba, 2006.
 8. Chhabra R.S., Bucher J.R. and Stokes WS. National Program strategies for use of alternative test systems. **Animal Alternative, Welfare and Ethics**, 1, 607, 1997.
 9. Posición de la autoridad regulatoria cubana en materia de medicamentos sobre los estudios alternativos en toxicología. Acta del I Taller Nacional Toxicología Alternativa, CECMED, Cuba, 1996.
 10. Resoluciones 3 y 4 de 1994 sobre la Acreditación de Laboratorios (basadas en el Anexo II del Artículo 5 de la Directiva 86/609/CCC, documentos de ICLAS y del Canadian Council of Animal Care). CECMED, Cuba, 1994.
 11. Zapatero Lorenzo J. Etica para el Uso de Animales de Laboratorio (Conferencia). X Congreso Latinoamericano de Toxicología, La Habana, 1998.
 12. Primer Curso para especialistas en Experimentación Animal de la Sociedad Cubana para la Ciencia del Animal de Laboratorio. BIOCEN, 2000.
 13. Regulación 39/04 Principios de las Buenas practicas de Laboratorio No Clínicos de seguridad sanitaria y medio ambiental. Publicación 00-35, CECMED, 2005. Disponible en: www.cecmed.sld.su/pages/AmbReg-4.htm. [Consultado: 2006].
 14. Georgina Velazco, Rosa Menéndez. Registro de Medicamentos Herbarios. **Rev. Cubana Plant. Med.**, 4, 1, 1999.
 15. Auletta C.S. Acute Systemic Toxicity. in Product Safety: Evaluation Handbook. Ed. Gad, S.C. Marcel Dekker, Inc., United States, Second Edition, 43-86, 1999.
 16. Putting C. Acute Oral Toxicity Testing Guidelines into Practice. Workshop organised by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), in partnership with the U.S. Environmental Protection Agency and the ILSI Risk Science Institute. 19-21, Bethesda, Maryland, 2002
 17. Chhabra R.S., Huff J.E., Schwetz B.S. and Selkirk J. A overview of prechronic and cronic toxicity/carcinogenicity experimental study designs and criteria used by the National Toxicology Program, United States, 1990.
 18. Piccirillo V.J. Repeated-Dose Toxicity Studis. In: Product Safety Evaluation Handbook: Ed. Gad S.C.; Ed. Marcel Dekker, Inc., United States, 201-222, 1999.
 19. Bucher J.P., Portier C.J., Goodman J.I., Faustman E.M. and Lucier G.W. Workshop overview: National Toxicology Program Studies: Principles of dose selection and applications to mechanism based risk assessment. **Fundamental Applied Toxicology**, 31, 1-8, 1996.
 20. Straughan D., Fentem J. and Balls M. Replacement alternative and complementary in vitro methods in pharmaceutical research. In: In vitro methods in pharmaceutical research, Ed. by Castell J.V. and Gómes-Lechón M.J. New York, Academic Press, Part I, Cap.1, 1-15, 1997.
 21. INVITOX Protocol. The FRAME modified neutral red uptake cytotoxicity test. No. 3a, 1990.
 22. INVITOX Protocol. The MTT assay. No. 17, 1990.
 23. INVITOX Protocol. The FRAME cytotoxicity test (Kenacid blue). No. 3b, 1992.
 24. INVITOX Protocol. The ARGATT/FRAME data bank of *in vivo* techniques in toxicology. The Ames test. No. 30, 1990.
 25. Anderson D. Genetic Toxicology. In Experimental Toxicology. The basic issues in. Second Ed., United States, Ed. By Anderson D. England, 243-286, 1993.
 26. Hayashi M., Tice R.R., MacGregor J.T., Anderson D. and Blakey D.H. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mut. Res.** 312, 293. 1994.
 27. Bonassi S., Fenech M., O. García, *et al.* Human Micronucleus Project: International Database. Comparison for Results with Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes. I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 37, 31-45, 2001.
 28. Mitchell A.D.: Genetic Toxicology Testing. In: Product Safety Evaluation Handbook. Ed. Gad S.C.; Marcel Dekker, Inc., United States, 167-200, 1999.
 29. Tice R.R., Agurell E. and Anderson D. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**, 35, 206-22, 2000.
 30. Collins A.R., Dushinska M. Horváthova E. and Munro E. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measure in vitro with th comet assay. **Mutagenesis**. 16, 297-305, 2001.
 31. Smith P.F. Third International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use- A toxicologist's perspective. **Toxicologic Pathology**, 24, 519-528, 1996.
 32. Brent R.L. The application of the principles of toxicology and teratology in evaluating the risks of new drugs for treatment of drug addiction in women of reproductive age. En Chiang C.N. and Finnegan L.P. (eds.). Research Monograph Series 149: Medications Development for the treatment of pregnant addicts and their infants, National Institute on Drug Abuse, Rockville, Maryland, 130-184, 1995.
 33. Tyl R.W. Developmental Toxicology. In General and Applied Toxicology. pp 1021-1046. Volumen 2. Stockton Press, New York, 1993.
 34. Expert Working Group (Safety) of the International Conference of Harmonization (ICH). Guideline for Industry: The need for long-term rodent carcinogenicity studies for pharmaceuticals. ICH S1A, 1996.
 35. Gad S.C. and Chengelis C.P. Animals models in toxicology. Drug and Chemical Series, 8, Gad S.C. Eds., New York, 1995.