

SISTEMI ALTERNATIVI *alla* SPERIMENTAZIONE ANIMALE

Annalaura Stammati

Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La direttiva europea 86/609 (Council Directive, 1986) sulla protezione degli animali utilizzati nella sperimentazione e per altri fini scientifici recita al comma 2 e 3 dell'art. 7:

Si eviterà di eseguire un esperimento qualora, per ottenere il risultato cercato, sia ragionevolmente e praticamente applicabile un altro metodo scientificamente valido che non implichi l'impiego di animali.

Quando è proprio necessario condurre un esperimento sugli animali, la scelta della specie deve essere considerata attentamente e, se necessario, spiegata all'autorità. Potendo, deve essere scelto l'esperimento che richiede il minor numero di animali, che coinvolge animali con il grado più basso di sensibilità neurofisiologica e che minimizza la sofferenza, il dolore, lo stress, pur fornendo risultati soddisfacenti. All'art. 23 dice inoltre che la Commissione e gli Stati Membri devono incoraggiare le ricerca per lo sviluppo e la validazione di tecniche alternative che possano fornire lo stesso livello di informazione di quello ottenuto in esperimenti che facciano uso degli animali, ma che coinvolgano meno animali o che contemplino procedure meno dolorose, e devono attivare ogni altro passo che considerino appropriato ad incoraggiare la ricerca in questo settore. La Commissione e gli Stati Membri devono monitorare le tendenze nei metodi sperimentali".

Il Decreto Legislativo n. 116 (1992), che recepisce la direttiva europea, ripete gli stessi concetti all'art. 4, inoltre, incoraggia lo sviluppo di metodi alternativi per *l'ottimizzazione dell'impiego degli animali* (art. 16) e stabilisce che nella programmazione dei piani di ricerca (art.17) *saranno preferiti, ove possibile, quelli che si avvalgono di metodi alternativi.*

In pratica sia la Direttiva europea che il D.Lvo, si rifanno alla definizione di metodi alternativi che risale ad un testo del 1959 (Russell e Burch, 1959), comunemente conosciuta come la definizione delle 3 R, dall'inglese *replace, reduce, refine*, per cui è alternativa alla sperimentazione animale una qualsiasi tecnica che:

- Rimpiazza totalmente l'uso degli animali con tecniche in vitro (*replacement*);
- Riduca il numero degli animali necessari ad eseguire un determinato saggio, pur ottenendo lo stesso livello di informazione (*reduction*);
- Raffini un metodo per ridurre la sofferenza imposta all'animale durante l'esecuzione di un saggio (*refinement*).

Il *replacement* è stato ulteriormente distinto da Russell e Burch in assoluto (l'animale non viene usato in nessuna fase dell'esperimento) e relativo (l'animale viene usato per un certo scopo, per esempio, per prelevare un organo o tessuto per preparare la coltura primaria), ma umanamente sacrificato, per limitarne al massimo la sofferenza.

Metodi alternativi e Replacement: proposta di nuove definizioni

Sia il termine "alternativo" (da sempre contestato sia dalle organizzazioni animaliste, che preferiscono "sostitutivo", che dagli ambienti della ricerca più tradizionali, che parlano di metodi complementari), che la definizione delle 3R sono stati messi di nuovo in discussione e riconsiderati, in un progetto europeo triennale del V programma quadro, Anim.Al.See, coordinato dalla Dott.ssa Maria Flavia Zucco dell'Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare del CNR. Al progetto

hanno partecipato ricercatori provenienti da diversi Paesi europei e appartenenti a diverse discipline, quali tossicologia in vitro, etologia, scienza degli animali da laboratorio e filosofia, allo scopo di discutere una serie di questioni legate alle 3R, anche in relazione al settore culturale, legale e politico del Paese di provenienza. Le nuove definizioni di alternativo e di *replacement*, quest'ultima elaborata dal gruppo di lavoro che ha affrontato questo aspetto, sono le seguenti:

Alternativa alla sperimentazione animale è:

- qualunque procedura (metodo o tecnica, proposta o approccio) volta a sostituirla un'altra che possa nuocere l'interesse degli animali, o
- volta a ridurre il numero di animali richiesti, o
- volta a migliorare la procedura in modo da ottimizzare il benessere degli animali durante la procedura stessa o nel suo contesto.

Absolute replacement: si riferisce a qualsiasi approccio o procedura che non usi animali. Alcuni aspetti legati all'uso di colture cellulari (preparazione di colture primarie o uso di siero fetale) sono da considerare nell'ambito delle altre due R.

Relative replacement: dovrebbe riferirsi soltanto a procedure in cui animali con sistema nervoso molto sviluppato vengono sostituiti con altri a basso sviluppo neurologico.

Validazione

I metodi in vitro o comunque alternativi all'uso degli animali sono comunemente usati nella ricerca di base con risultati soddisfacenti per lo studio di meccanismi di natura diversa. La cosa si complica quando si tratta di sviluppare metodi alternativi, che possano sostituire i saggi in vivo ancora richiesti dalle legislazioni nazionali e internazionali. In questo caso, infatti, i nuovi metodi sviluppati e che hanno mostrato una certa attendibilità, devono essere sottoposti al processo di validazione, che serve ad accertare l'affidabilità (riproducibilità del metodo nel tempo e in laboratori diversi) e la rilevanza (significatività ed utilità di una procedura per il fine prefissato) di un metodo per uno scopo specifico (Balls et al., 1995). Questo è un processo piuttosto lungo ed è stato calcolato che intercorrono in media dieci anni per il compimento delle diverse fasi. Esso prevede, infatti: a) lo sviluppo del saggio nel laboratorio d'origine; b) la prevalidazione mirata alla verifica della trasferibilità del metodo e all'ottimizzazione del suo protocollo; c) lo studio di validazione vero e proprio; d) la valutazione indipendente dello studio e delle proposte; e) l'avvio delle procedure per l'accettazione a livello regolatorio. Prima di arrivare allo schema descritto sono state necessarie una serie di riunioni di esperti (Frazier, 1990; Balls et al., 1990a; Balls et al. 1990b; Balls e Clothier, 1991; Ekwall et al., 1991), che hanno elaborato il concetto di validazione e quindi modificato negli anni la procedura, anche sulla base dell'esperienza acquisita. Un processo lungo, dunque e che fino ad ora, come già detto ha prodotto maggiori risultati sul versante *reduction/refinement*, ma lo scenario offerto dalle nuove tecnologie suscita un certo ottimismo per quanto riguarda lo sviluppo di nuovi metodi che colmino il versante *replacement*. Infatti, già da alcuni anni la tossicologia tende ad orientarsi verso l'individuazione di parametri molecolari precoci ed affidabili e lo studio della loro alterazione in seguito all'esposizione a sostanze tossiche (Marshall, 1993). Si sta inoltre aprendo una nuova era, quella genomica, che consente l'acquisizione di tecniche sempre più sofisticate e in grado di dare risposte sempre più precise e mirate (Isfort and Lederberg, 2000). E' anche per questo che è stato recentemente proposto di chiamare i metodi che non si basano sull'uso di animali, non più alternativi, ma "avanzati".

Saggi di *replacement* validati

Corrosione della pelle

Questo saggio viene fatto per osservare l'eventuale produzione di alterazioni reversibili di tipo infiammatorio (irritazione) o di danni irreversibili (corrosione) in seguito all'applicazione di sostanze sulla pelle e permette di classificarle in base alla loro pericolosità e di etichettarle,

soprattutto ai fini della sicurezza durante la manipolazione ed il trasporto. Il protocollo, contenuto nella LG 404 adottata nel 1981, prevede l'uso di diverse specie di mammifero, anche se il coniglio albino è quella preferita, perché considerata più sensibile dell'uomo, in particolare agli irritanti deboli e moderati. La sostanza in esame viene applicata sulla pelle rasata del coniglio e alla fine del periodo di esposizione (circa 4 ore) si va ad osservare il danno corrosivo o l'irritazione sviluppatasi (in questo caso viene assegnato un punteggio al grado di eritema/edema osservato), riferendosi come controllo a una parte di pelle non trattata dello stesso animale. Questa procedura è stata molto criticata dal punto di vista etico, ma anche scientifico, perché il saggio è qualitativo e troppo legato all'interpretazione dell'operatore. Una prima revisione della LG risale al 1992, con la novità di poter utilizzare, almeno in una prima fase, un solo animale per un tempo più breve nel caso di sostanze presunte corrosive sulla base della struttura chimica o del pH. Questa nuova versione prevede anche la possibilità di valutare i risultati di test in vitro prima di procedere alla prova sugli animali. La nuova proposta di aggiornamento (draft 2000), già approvata in sede OCSE, differisce dalla versione precedente perché la linea guida è accompagnata da un "documento guida", che suggerisce una strategia a tappe volta a scoraggiare l'uso del saggio in vivo (Worth et al., 1998).

Saggi alternativi

Si è in un primo momento cercato di sviluppare test in vitro in grado di identificare le sostanze corrosive, compito che si è rivelato relativamente più semplice rispetto ad altri tipi di danno, perché questa lesione non è legata a meccanismi di azione particolarmente sofisticati.

Sono oggi disponibili tre modelli di pelle umana ricostituita considerati scientificamente validi dal Comitato Scientifico di ECVAM: EPISKINTM, EpiDerm e Corrositex. I protocolli relativi all'uso di questi modelli sono stati introdotti durante il 27° Meeting for Adaptation to Technical Progress (4 febbraio 2000) nell'annesso V "Testing Methods" della Direttiva 67/548/EEC (B.40 Bis. In vitro skin corrosion: human skin model test) e nella linea guida OCSE 431.

Episkin-SMTM.- Questo è un kit commerciale, costituito da una matrice di collagene umano tipo I e III che rappresenta il derma, coperta da un film di collagene umano tipo IV su cui è stratificata epidermide differenziata derivata da cheratinociti umani. Questi ultimi vengono esposti alla sostanza in esame e la vitalità del tessuto è valutata misurando l'attività mitocondriale con un test come MTT, comunemente usato nei saggi di citotossicità. Questo modello di pelle umana ricostituita è stato considerato valido da ESAC (ECVAM, 1998) perché ha individuato correttamente sostanze note, classificate in vivo in categorie di rischio in base alla loro capacità di provocare corrosione entro tempi stabiliti.

EpiDerm e Corrositex sono simili al precedente e dichiarati scientificamente validati da ESAC (ECVAM, 2000; 2001) ma, quest'ultimo può essere utilizzato solo per identificare basi organiche e acidi inorganici e loro derivati.

Fototossicità

Un discorso particolare è quello della fototossicità, reazione acuta che può essere causata da un singolo trattamento con una sostanza contemporaneamente all'esposizione alle radiazioni visibili o UV. Alcune linee guida internazionali riportano delle raccomandazioni per la conduzione di studi di fototossicità, tuttavia la OCSE non ha ancora accettato una linea guida per studi di fotoirritazione in vivo, ma ha raccomandato l'uso di saggi in vitro, prima di ricorrere ai test con gli animali (OCSE, 1996). Gli studi in vivo per individuare il potenziale fototossico di sostanze chimiche utilizzano principalmente topi, conigli, ratti e cavie, ma i dati disponibili in letteratura sono difficilmente controllabili perché, in mancanza di un protocollo standardizzato, sono state utilizzate diverse fonti di luce e UV, diversi tempi e siti di esposizione e diverse dosi.

Saggi alternativi

I metodi in vitro sviluppati in questo settore comprendono saggi per lo screening di sostanze fototossiche, che usano principalmente cellule in coltura, e modelli basati sui meccanismi

molecolari e cellulari della fototossicità (Spielmann *et al.*, 1994). Di questi solo uno, il saggio di assunzione di rosso neutro con cellule Balb/c 3T3, è stato considerato scientificamente valido da ESAC (ECVAM, 1998a) e il protocollo è già presente nella Direttiva europea (B 41. In vitro 3T3 NRU phototoxicity test) e nella linea guida OCSE 432.

Saggio di assunzione del rosso neutro con cellule Balb/c3T3.- Il saggio 3T3 NRU PI prevede l'uso di fibroblasti di topo (Balb/c 3T3, clone 31), sui quali, dopo trattamento con la sostanza in esame e dopo opportuno irraggiamento, viene effettuato il test di assunzione del rosso neutro.

Questo è un test di vitalità che si basa sull'assorbimento del colorante vitale all'interno dei lisosomi delle cellule ancora integre. Il saggio di assunzione del rosso neutro è stato pubblicato per la prima volta nel 1985 (Borenfreund e Puerner, 1985) come possibile alternativa in vitro al test di Draize sul coniglio ed utilizzato, sia pure dopo lievi aggiustamenti, per evidenziare il potere irritante di sostanze di varia natura. Successivamente il protocollo è stato modificato per adattarlo al test di fototossicità, introducendo una fase di incubazione con la sostanza in esame prima dell'irraggiamento ed utilizzando una soluzione di sali di Earles come mezzo di incubazione delle cellule durante il periodo di irraggiamento. Durante la fase di prevalidazione e lo studio di validazione vero e proprio che è stato condotto da 9 laboratori con risultati riproducibili, il test ha dimostrato di essere predittivo e di saper discriminare tra sostanze fotoirritanti e non.

Assorbimento cutaneo

Per assorbimento cutaneo si intende il processo mediante il quale una sostanza è trasportata dallo strato corneo attraverso l'epidermide ed il derma, fino a raggiungere il sistema circolatorio e quindi i diversi tessuti dell'organismo (de Heer *et al.*, 1999). I dati di assorbimento cutaneo sono generalmente richiesti per accertare il possibile rischio di sostanze che possono venire a contatto con la pelle sia volontariamente (cosmetici o farmaci) che accidentalmente (pesticidi, ecc.).

Esistono metodi più o meno accurati per la stima dell'assorbimento cutaneo in vivo (Kemppainen e Reifenrath, 1990; Marco *et al.*, 1985) che utilizzano preferenzialmente il ratto. I limiti di questi studi sono legati soprattutto al fatto che la pelle degli animali, anche quella del ratto, è più permeabile di quella umana e quindi, nel caso di una estrapolazione dei risultati all'uomo, è necessario tener conto di questa maggiore sensibilità del modello animale. Esistono anche difficoltà di tipo pratico legate al fatto che è necessario proteggere il sito di applicazione della sostanza in esame per evitare che l'animale possa in qualche modo asportarne una parte, ma recentemente è stata approvata una linea guida OCSE, la 427, che contiene il protocollo per studi di assorbimento in vivo.

Saggi alternativi

I saggi in vitro attualmente disponibili per misurare l'assorbimento cutaneo (Franz, 1975; Bronaugh e Collier, 1991; Howes *et al.*, 1996; Roberts and Walters, 1998) si basano fondamentalmente sulla misura della diffusione del composto in esame dalla superficie del campione di pelle in un recipiente di raccolta. In sostanza la cella di penetrazione è divisa da un campione di pelle in una "camera superiore" e una "inferiore" contenente un liquido "recettore" la cui composizione non deve alterare l'integrità della pelle e le sue caratteristiche di permeabilità (Figura 1).

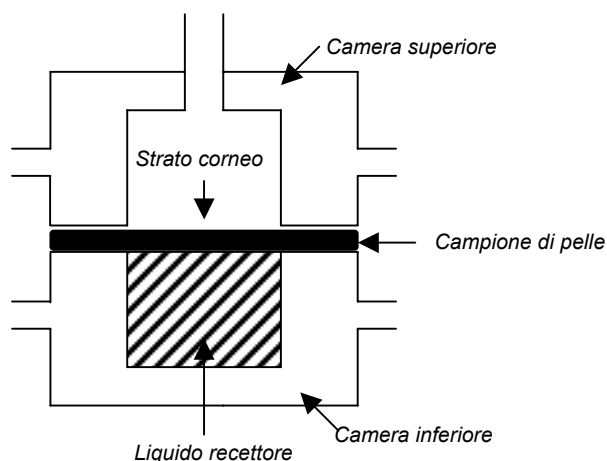


Figura 1 - Schema della cella per lo studio dell'assorbimento cutaneo.

I campioni di pelle sono normalmente preparati sotto forma di dischi di grandezza adeguata alla cella e possono essere costituiti da: 1) pelle intera, 2) derma separato dalla parte superiore del derma stesso e dall'epidermide con un dermatomo, 3) membrane epidermiche preparate trattando la pelle intera con mezzi enzimatici o chimici o con il calore. In ogni caso, il campione viene collocato nella cella con lo strato corneo rivolto verso la camera superiore e, prima di applicare la sostanza in esame, ogni campione di pelle deve essere controllato per la sua integrità con metodi diversi (penetrazione di una molecola marcata, misura della resistenza elettrica o della perdita di acqua attraverso l'epidermide). I dettagli di questo sistema in vitro per l'assorbimento cutaneo sono riportati nella linea guida sviluppata dal COLIPA (Diembeck *et al.*, 1999) che sostanzialmente riprende i principi contenuti nella linea guida OCSE 428 nella direttiva europea (B45. Skin absorption: in vitro method).

Embriotossicità

Questo saggio dà informazioni sugli effetti dell'esposizione prenatale e sullo sviluppo dell'embrione. Il protocollo, riportato nella linea guida OCSE 414, prevede l'uso di ratti e conigli.

Saggi alternativi

Anche in questo settore sono stati sviluppati e validati dei metodi che consentono di individuare possibili effetti nocivi sull'embrione (Genshow, 2002). Tra questi, un saggio che sostituisce completamente l'uso degli animali è quello chiamato EST (embryonic stem cell test), che si basa sull'uso di cellule staminali (ECVAM, 2002). Il saggio è stato giudicato positivamente, perché i 4 laboratori partecipanti allo studio di validazione internazionale hanno ottenuto risultati riproducibili. Inoltre, la correlazione tra i dati in vivo e quelli in vitro è stata buona e il saggio ha mostrato di saper riconoscere al 100% le sostanze fortemente embriotossiche e con sufficiente precisione anche quelle debolmente o non embriotossiche. Questo metodo, come pure altri due (Micromass e Whole Embryo), che rientrano nel settore della riduzione, non sono ancora entrati nell'annesso V della Direttiva europea e nelle linee guida OCSE.

Prodotti biologici

Sono già disponibili anche nel settore dei prodotti biologici dei metodi per la produzione di anticorpi monoclonali (ECVAM, 1998b), o per controllare l'attività di vaccini per uso umano o veterinario (ECVAM, 2001a, 2001b, 2002a, 2002b, 2002c). Questi metodi sono stati accettati dalla Farmacopea europea.

Ecopa e Piattaforme Nazionali

Allo scopo di accelerare lo sviluppo, la validazione e l'uso di metodi alternativi sono state più o meno recentemente costituite in diversi Paesi europei le Piattaforme Nazionali (PN), che richiedono, per essere considerate tali, la presenza di 4 figure rappresentanti di: governo, Università e/o Centri di ricerca, industria e organizzazioni animaliste. Le PN hanno compiti di grande importanza, quali comunicazione, informazione, formazione e addestramento e promozione, sia per quanto riguarda gli aspetti etici, che scientifici relativi ai metodi alternativi. Le PN sono coordinate a livello europeo da Ecopa, European Consensus of Platforms on Alternatives (<http://www.ecopa.tsx.org>), con lo scopo di ottimizzare il lavoro delle diverse PN, di minimizzare i conflitti che dovessero sorgere circa la strategia da seguire per il raggiungimento delle 3R (refinement, reduction, replacement) e, comunque, di facilitare il collegamento tra le PN e tra queste e la Commissione europea.

Questo tipo di organizzazione si sta diffondendo in tutta Europa, infatti undici Paesi (Austria, Belgio, Finlandia, Germania, Inghilterra, Italia, Olanda, Repubblica Ceca, Spagna, Svezia e Svizzera) hanno già delle PN ufficialmente costituite e tre (Danimarca, Norvegia e Polonia) sono membri associati di Ecopa, perché ancora in fase di organizzazione. La Piattaforma italiana, IPAM è stata fondata a maggio 2003 da 14 persone appartenenti alle 4 aree (Istituzioni governative: 3, Mondo scientifico: 5, Industria: 4, Organizzazioni animaliste: 2), che dopo una serie di riunioni informali hanno concordato uno statuto e avviato ufficialmente l'attività. Presto tutte le informazioni sulla piattaforma potranno essere trovate sul sito www.ipamitalia.it.

Referenze bibliografiche

BALLS, M., BLAAUBOER, B.J., FENTEM, J.H., BRUNER, L., COMBES, R. D., EKWALL, B., FIELDER, R. J., GUILLOUZO, A., LEWIS, R. W., LOVELL, D. P., REINHARDT, C. A., REPETTO, G., SLADOWSKI, D., SPIELMANN, H., ZUCCO, F. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. ECVAM Workshop Report 5, *ATLA- Alternative Laboratory Animal Science* 1995, 23: 129-147.

BALLS, M., CLOTHIER, R.H. Comments on the scientific validation and regulatory acceptance on in vitro toxicity tests. *Toxicology in vitro* 1991, 5: 535-538.

BALLS, M., BLAAUBOER, B.J., BRUSICK, D., FRAZIER, J.F., LAMB, D., PEMBERTON, M., REINHARDT, C., ROBERFROID, M., ROSENKRANZ, H., SCHMID, B., SPIELMANN, H., STAMMATI, A., WALUM, E. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA- Alternative Laboratory Animal Science* 1990, 18: 313-337.

BALLS, M., BOTHAM, P., CORDIER, A., FUMERO, S., KAYSER, D., KOETER, H., KUONDAKJIAN, P., LINDQUIST, N.G., MEYER, O., PIODA, L., REINHARDT, C., ROZEMOND, H., SMYRNIOTIS, T., SPIELMANN, H., VAN LOOY, H., VAN DER VENNE, M.T., WALUM, E. Report and Recommendations of an international workshop on promotion of the regulatory acceptance of validated non-animal toxicity test procedures. *ATLA- Alternative Laboratory Animal Science* 1990a, 18: 339-344,

BORENFREUND, E., PUERNER, J. Toxicity determined in vitro by morphological alteration and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 1985, 24: 119-224.

BRONAUGH, R.L., COLLIER, S.W. Protocol for in vitro percutaneous absorption studies. In: *In vitro percutaneous absorption: principles, fundamentals and applications*. R.L. Bronaugh and H.I.

Maibach (Eds.), CRC Press, Boca Raton, 1991, p. 237-241.

COUNCIL DIRECTIVE of 24 Novembre 1986 on the approximation laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities* 1986, No L. 358/1, 18/12/86.

DECRETO LEGISLATIVO n° 116. Attuazione della direttiva n° 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. G.U. n° 40, 18/2/1992, p. 5-25.

DE HEER, C., BOSMAN-HOEFACKER, S., HAKKERT, B.C. *Principles for study protocols addressing the dermal absorption of pesticides*. TNO report V98.356, TNO Nutrition and Food Research Institute, 1999. p. 1-29.

DIEMBECK, W., BECK, H., BENECH-KIEFFER, F., COURTELLEMONT, P., DUPUIS, J., LOVELL, W., PAYE, M., SPENGLER, J., STEILING, W. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology* 1999, 37: 191-205.

ECVAM News and Views. Statement on the scientific validity of the EPISKIN™ test (an in vitro test for skin corrosivity). *ATLA-Alternative Laboratory Animal Science* 1998, 26, 278-280.

ECVAM News and Views. Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxic potential). *ATLA-Alternative Laboratory Animal Science* 1998a, 26, 7-8.

ECVAM. Statement on the scientific acceptability and practical availability of in vitro methods for the production of monoclonal antibodies. *ATLA* 1998b; 26: 383-385.

ECVAM News and Views. Statement on the application of the EpiDerm™ human skin model for skin corrosivity testing. *ATLA-Alternative Laboratory Animal Science* 2000, 28, 365-367.

ECVAM News and Views. Statement on the application of the Corrositex® assay for skin corrosivity testing. *ATLA-Alternative Laboratory Animal Science* 2001, 29, 96-97.

ECVAM. Statement on the application of the ELISA procedure for the batch potency testing of tetanus vaccines for human use. *ATLA* 2001a; 29: 93-94.

ECVAM. Statement on the application of the ToBI test for the batch potency testing of tetanus vaccines for human use. *ATLA* 2001b; 29: 94-96.

ECVAM News and Views. Statement on the scientific validity of the embryonic Stem Cell Test (EST)-an in vitro test for embryotoxicity. *ATLA-Alternative Laboratory Animal Science* 2002, 30, 265-268.

ECVAM. Statement on the validity of a serological method (ELISA) for the batch potency testing of inactivated swine erysipelas vaccines. *ATLA* 2002a; 30: 485-487.

ECVAM. Statement on the batch potency testing of erythropoietin concentrated solution. *ATLA* 2002b; 30: 487-489.

ECVAM. Statement on the relevance of the target animal safety test for batch safety testing of vaccines for veterinary use. *ATLA* 2002c; 30: 489-491.

EKWALL, B., BONDESSON, I., HELLBERG, S., HOGBERG, J., ROMERT, L., STENBERG, K., WALUM, E. Validation of in vitro cytotoxicity tests -past and present strategies. *ATLA Alternative Laboratory Animal Science* 1991, 19: 226-233.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology* 1975, 64: 190-195.

FRAZIER, J. F. *Scientific criteria for validation of in vitro toxicity tests*. OECD Environment Monograph No.36, 1990, 62 p.

GENSHOW, E., SPIELMANN, H., SCHOLZ, G., SEILER, A., Brown, N., PIERSMA, A., BRADY, M., CLEMANN, N.,HUUSKONEN, H., PAILLARD, F., BREMER, S. & Becker K: The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *ATLA- Alternative Laboratory Animal Science*, 2002, 30, 151-176.

HOWES, D., GUY, R., HADGRAFT, J., HEYLINGS, J.R., HOECK, U., KEMPER, F., MAIBACH, H., MARTY, J.-P., MERK, H., PARRA, J., REKKAS, D., RONDELLI, I., SHAEFER, H., TAUBER, U. and VERBIESE, N. Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report 13. *ATLA- Alternative Laboratory Animal Science*, 1996, 24: 81-106.

KEMPPAINEN, B.W., REIFENRATH, W.G., Eds. *Methods for skin absorption*. Boca Raton: CRC press, 1990.

ISFORT, R.J. and LEDERBERG J., Eds. Toxicology for the next millennium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 919, 2000.

MARSHALL, E. Toxicology goes molecular. *Science* 1993, 259, 1394

OCSE (Organisation for Economic Cooperation and Development), *OECD Workshop on harmonisation of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods*. Paris: OECD Environment Directorate, Chemicals Group and Management Committee. Test Guidelines Programme, 1996, 15.

ROBERTS, M.S., WALTERS, K.A., Eds. *Dermal absorption and toxicity assessment*. Drugs and Pharmaceutical Sciences series, New York, Marcel Dekker, 1998, Vol. 91.

RUSSEL, W.M.S., BURCH, R.L. *The principle of human experimental technique*. London: Meuthen, 1959 (University Federation for Animal Welfare, Special Edition, 1992).

SPIELMANN, H., LOVELL, W.W., HOLZLE, E., JOHNSON, B.E., MAURER, T., MIRANDA, M.A., PAPE, W.J.W., SAPORA, O., SLADOWSKI, D. In vitro phototoxicity testing. ECVAM Workshop Report 2. *ATLA- Alternative Laboratory Animal Science* 1994, 22: 314-348.

WORTH, A.P., FENTEM, J.H., BALLS, M., BOTHAM, P.A., CURREN, R.D., EARL, L.K., ESDAILE, D.J., LIEBSCH, M. An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA-Alternative Laboratory Animal Science* 1998, 26: 709-720.