



THE EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY
FOR ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING

Aproximaciones alternativas en toxicidad aguda

Pilar Prieto

www.jrc.ec.europa.eu

*Serving society
Stimulating innovation
Supporting legislation*



Contenido

- Toxicidad sistémica aguda: marco regulatorio, procedimientos estándar vigentes, conocimiento del mecanismo de acción
- Estudio de validación del test 3T3 NRU
- Combinación de métodos alternativos
- Oportunidades para evitar ensayos redundantes con animales

Toxicidad sistémica aguda

Efectos adversos que se manifiestan tras la **exposición a una dosis única o múltiple** de una sustancia **a lo largo de un máximo de 24 horas** y durante un **periodo de observación de al menos 14 días**

VIA ORAL	VIA DERMICA	VIA INHALATORIA
OECD TG 420: Dosis Fija (5-7 animales)	OECD TG 402: LD₅₀ Clásica (10-30 animales)	OECD TG 403: LC₅₀ Clásica (40-80 animales)
OECD TG 423: Clase Tóxica Aguda (6-7 animales)		OECD TG 436: Clase Tóxica Aguda (6-9 animales)
OECD TG 425: Arriba y Abajo (5-9 animales)		

Utilidad principal: **Clasificar y etiquetar** sustancias (con los valores de **LD₅₀** o **LC₅₀** que definen los límites de las categorías de toxicidad aguda)



Marco Regulatorio

Compuestos químicos (REACH)	<ul style="list-style-type: none">• Anexo VII (1-10 tpa): vía oral• Anexo VIII-X (10->1000 tpa): vía oral y una segunda vía de exposición
Agroquímicos (Reglamento (CE) No 1107/2009)	<ul style="list-style-type: none">• Sustancias activas: vía oral y dérmica. Vía inhalatoria excepto si la exposición se pueda excluir• Formulaciones: vía oral y dérmica. Cálculo es posible.
Biocidas (Nuevo Reglamento (UE) No 528/2012)	<ul style="list-style-type: none">• Otras vías de administración sólo si se cumplen criterios específicos• Ensayo <i>in vitro</i> de absorción cutánea (OECD 428) antes del ensayo de toxicidad cutánea aguda.• Sólo en casos excepcionales tres vías de administración.
Cosméticos (Reglamento UE 2009)	<ul style="list-style-type: none">• Ensayos con animales prohibidos en Europa desde 2009• CCPC (2009): toxicidad aguda (si disponible)
Medicamentos ICH M3(R2)	<ul style="list-style-type: none">• Eliminado – no es útil como apoyo al primer estudio clínico en humanos ni proporciona datos adicionales en el tratamiento de sobredosis.



Mecanismos de acción

(1) Gennari et al., 2004. ECVAM Workshop Report on Strategies to Replace *In vivo* Acute Systemic Toxicity. *ATLA*, 32:437-459.

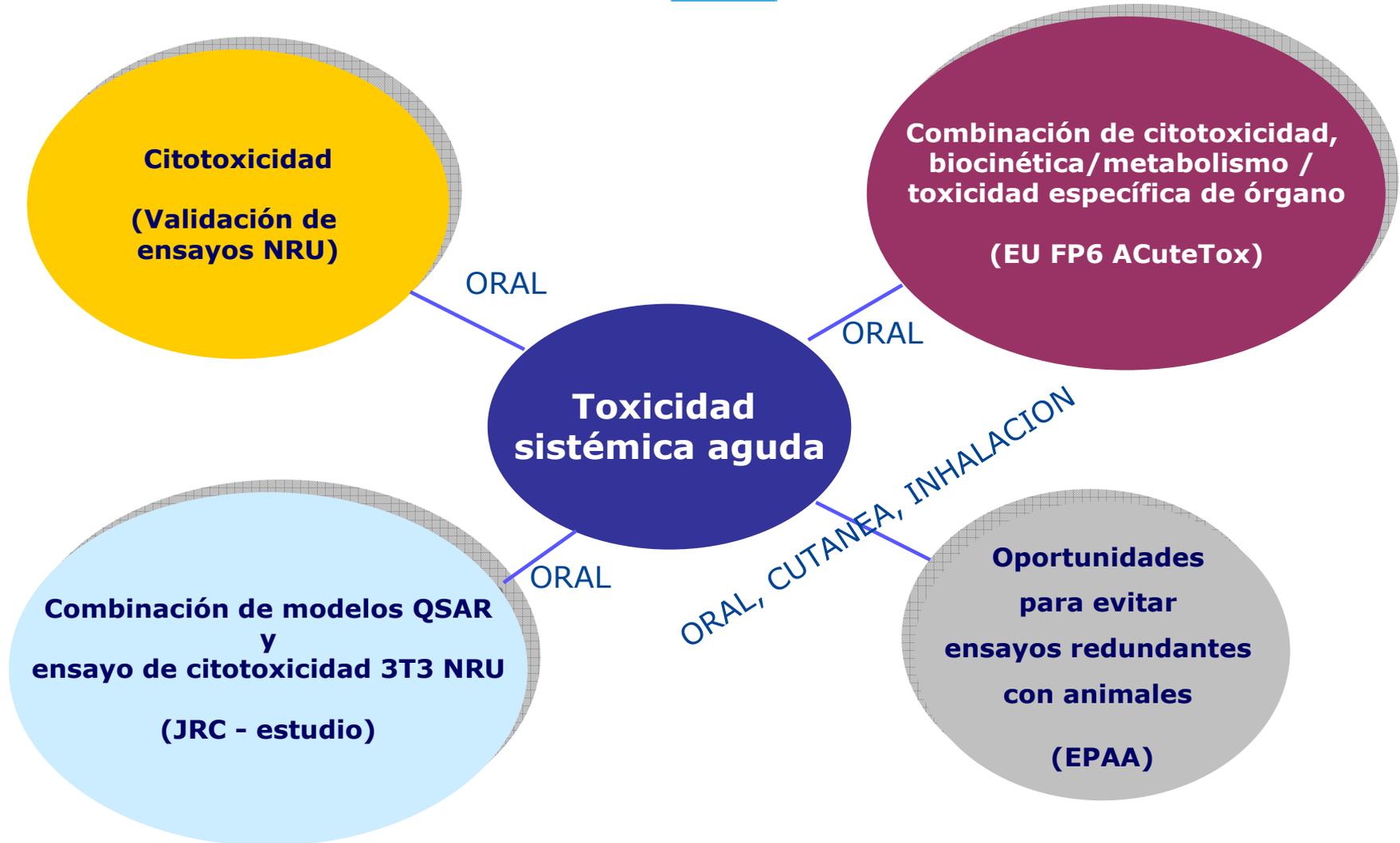
(2) ICCVAM-NICEATM/ECVAM, JaCVAM Workshop Report on Acute Chemical Safety Testing. NIH, 2009.

Interferencia sobre procesos basales comunes a todas las células (Citotoxicidad basal)

- Buena correlación entre toxicidad sistémica *in vivo* (LD₅₀) y citotoxicidad *in vitro* (IC₅₀).
- ¿Es el resultado de mecanismos celulares exclusivos de ciertos órganos o sistemas o se debe a la interferencia con funciones generales comunes a la mayoría de las células?.
- Proyecto MEIC: la toxicidad aguda es debida a alteraciones no específicas de funciones celulares.
- Conocimiento limitado del mecanismo de acción de las secuencias clave en la toxicidad sistémica aguda.

Interferencia sobre mecanismos específicos de un órgano o sistema

Biocinética/metabolismo





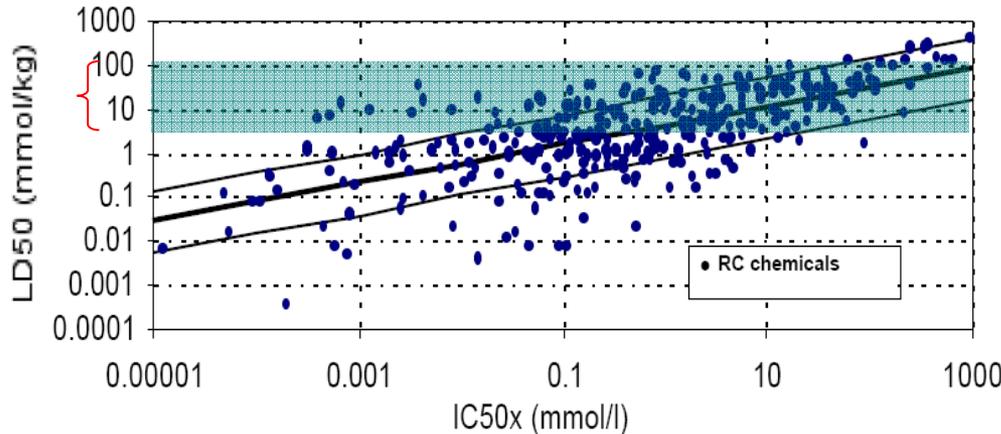
Estudio de validación para evaluar la **capacidad predictiva** del **test de citotoxicidad *in vitro* de incorporación del rojo neutro en células 3T3 para identificar sustancias que no requieren clasificación** para la toxicidad oral aguda (**LD₅₀ > 2000 mg/kg b.w.**)

Prieto, P., et al., Regul. Toxicol. Pharmacol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.013>



Razonamiento

De: *Registro de Citotoxicidad (W. Halle, 2003, ATLA, 31:89-198)*



- Correlación ~ 60 - 70% entre valores de IC_{50} *in vitro* y valores orales de LD_{50} en rata
- Los valores de citotoxicidad predicen mejor la toxicidad sistémica baja

GHS Acute Oral Toxicity Category LD_{50} (mg/kg b.w.)	Prevalence
Category 1: $LD_{50} < 5$	0.05%
Category 2: $5 < LD_{50} \leq 50$	0.31%
Category 3: $50 < LD_{50} \leq 300$	3.41%
Category 4: $300 < LD_{50} \leq 2000$	9.39%
Category 5: $2000 < LD_{50} \leq 5000$	70.16%
Not classified: $LD_{50} > 5000$	16.69%

Prevalencia toxicidad oral aguda (base de datos Europa de sustancias químicas nuevas - 4773 sustancias con datos de toxicidad oral)

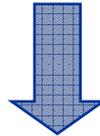
Bulgheroni et al., 2009, Regulatory Toxicology and Pharmacology 53:16-19

EU CLP: No clasificada

87%
 $LD_{50} > 2000$

Suposiciones

- Si el ensayo de citotoxicidad 3T3 NRU permitiera discriminar sustancias no clasificadas según EU CLP sin dar falsos negativos.
- Si la alta prevalencia de sustancias no clasificadas fuera la misma en el conjunto de sustancias químicas registradas

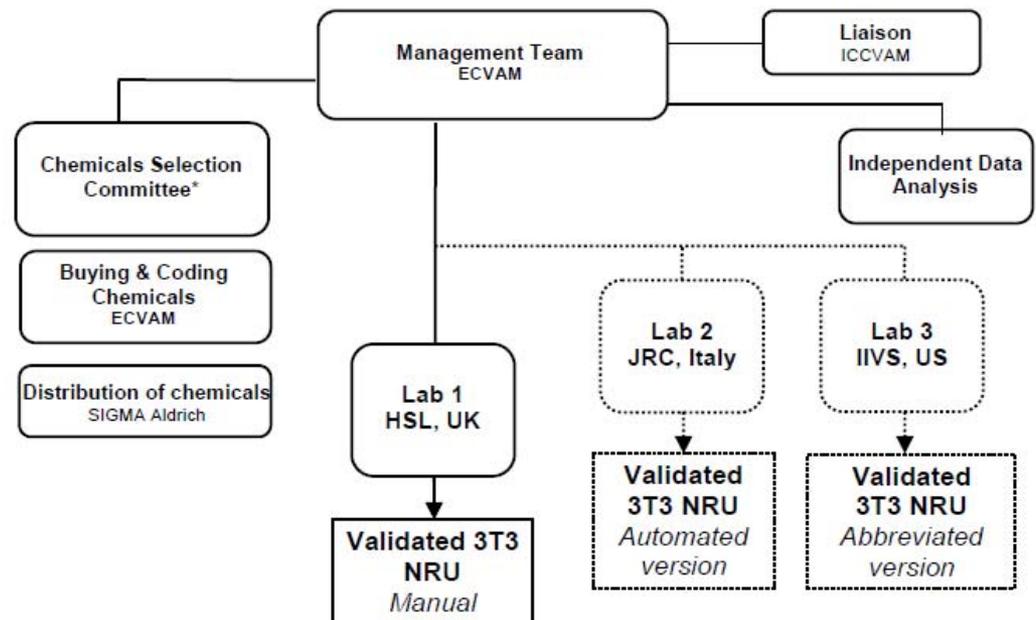


El uso de este método de ensayo podría reducir potencialmente los ensayos *in vivo* de toxicidad oral aguda si se utiliza en una estrategia integrada, o como apoyo de estrategias de aproximación o peso de la evidencia para identificar sustancias no clasificadas

Objetivo del estudio

Evaluar la capacidad predictiva del **ensayo de citotoxicidad 3T3 NRU para identificar sustancias que no requieren clasificación** según Reglamento Europeo CLP (sustancias no clasificadas por vía oral con **LD₅₀ > 2000 mg/kg**)

Protocolo y modelos de regresión IC₅₀-LD₅₀ del estudio de validación NICEATM/ECVAM (NIH, 2006)





Sustancias químicas

56 sustancias químicas (27 usadas también como ingredientes en cosméticos)

- ✓ Variedad de estructuras moleculares, representación equilibrada de líquidos y sólidos y amplia gama de propiedades fisicoquímicas

Distribución de sustancias químicas usando el punto de corte de LD₅₀ de 2000 mg/kg b.w.

Clasificada LD ₅₀ ≤ 2000 mg/kg	No clasificada LD ₅₀ > 2000 mg/kg
24 (43%)	32 (57%)

Análisis de datos

1. Estimación de LD₅₀ a partir de valores de IC₅₀:

- "Millimol regression model":

$$\text{Log LD}_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.439 \log \text{IC}_{50} (\text{mM}) + 0.621$$

- "Weigth regression model":

$$\text{Log LD}_{50} (\text{mg/kg}) = 0.372 \log \text{IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2.024$$

2. Reproducibilidad intralaboratorio: concordancia de la toxicidad predecida de la sustancia (clasificada o no clasificada) en experimentos independientes

3. Reproducibilidad entre protocolos: Concordancia de las predicciones de cada sustancia con cada protocolo

4. Capacidad predictiva: Comparando la toxicidad predecida *in vitro* con la toxicidad observada *in vivo*

Resultados

Reproducibilidad intralaboratorio	
"Millimole regression"	94% - 100%
"Weight regression"	93% - 98%

"Millimole regression"

Reproducibilidad entre protocolos	
Entre los 3 protocolos	88%
Manual-automatizado	95%
Manual-abreviado	91%
Automatizado-abreviado	90%



Resultados

Capacidad predictiva			
	Versión Manual	Versión automatizada	Versión abreviada
Exactitud (%)	64	67	65
Sensibilidad (%)	94	92	96
Especificidad (%)	42	44	40
Falsos Positivos	15	15	18
Falsos Negativos	1	2	1

Bencil benzoato

Harmful
(tox. cat. 4)

- 1,2,4-Triclorobenceno
- Bencil benzoato

Harmful
(tox. cat. 4)

Aconitina

Fatal
(tox. cat. 2)



Conclusiones

1. **Sensibilidad alta** (~95%) y **un índice bajo de falsos negativos** (< 5%): sustancias estimadas como negativas son con alta certeza verdaderos negativos, al menos que actúen a través de mecanismos de acción específicos o que requieran activación metabólica.
2. Debido a sus limitaciones, los resultados obtenidos se deberán **usar siempre junto con** otra información ya sea en estrategias **de peso de la evidencia** o **estrategias de ensayo integradas**.
3. El **índice de falsos positivos es alto** y por ello los resultados positivos no se pueden usar de inmediato de forma coherente.
4. El test **informa sobre la citotoxicidad general** y se puede automatizar, por lo que proporciona información de forma económica que puede complementar otros datos en contextos diversos.
5. El test parece **útil** en **estrategias de ensayo** para **identificar sustancias potencialmente negativas**, en particular en la evaluación de **sustancias químicas** (p.ej. REACH).



Resultado general

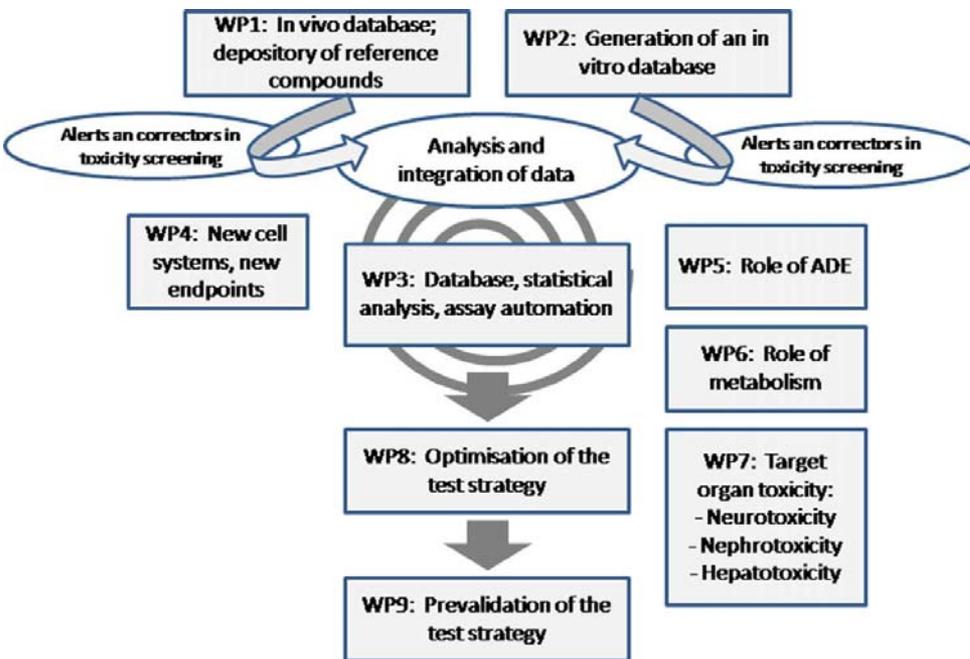
- Respaldan el uso del 3T3 NRU dentro de una estrategia de ensayo para identificar sustancias no clasificadas por vía oral.

- Las estrategias de ensayo propuestas no mejoran significativamente la clasificación de sustancias en las categorías CLP 1-4

- Las estrategias propuestas tienden a sobre predecir la toxicidad (necesidad de evaluar mejor los parámetros cinéticos)

- Valor añadido de los tests *in vitro* de toxicidad de órgano: alertan sobre toxicidad específica (p. ej. neurotoxicidad)

Número special en TIV (on-line): Prieto et al.; Zurich et al; Kinsner-Ovaskainen et al.; Clothier et al.; Lahoz et al.; Kopp Schneider et al.; Stanzel et al.



Joan Albert Vericat formó parte del Steering Committee, Management Board y lideró el WP sobre toxicidad de órgano

Combinación de modelos de QSAR y citotoxicidad

- **4 software QSAR** para predecir toxicidad oral aguda (LD_{50})
 - ACD/Tox Suite, version 2.95
 - Accelrys/TOPKAT, version 6.2
 - U.S. EPA/ T.E.S.T., version 4.0
 - ADMET Predictor, version 5.5
- **Ensayo de citotoxicidad 3T3 NRU junto con modelo de regresión para predecir valores de LD_{50}**
- **180 sustancias**
- **Tres clases de toxicidad** oral aguda:

Categorías CLP 1,2 y 3 = Clase de toxicidad 1	(55 sustancias)
Categoría CLP 4 = Clase de toxicidad 2	(60 sustancias)
No clasificado = Clase de toxicidad 3	(65 sustancias)



Conclusions

- Los modelos de QSAR ACD/Tox Suite (versión 2.95) y U.S. EPA/ T.E.S.T. (versión 4.0) usados individualmente dieron los mejores resultados predictivos (exactitud $\sim 70\%$) .
- La capacidad de predecir las tras clases de toxicidad con el test 3T3 NRU resulto baja (exactitud $\sim 42\%$) pero mayor dominio de aplicación.
- El uso combinado de los 5 métodos alternativos no mejora significativamente la capacidad predictiva, pero permite clasificar las sustancias de acuerdo a las necesidades del usuario optimizando la sensibilidad o la especificidad o la exactitud.



Colaboración EPAA – proyecto de toxicidad aguda

Plataforma sobre 3Rs en ámbito regulatorio

En: Toxicological Sciences
116(2), 382-396 (2010)



FORUM

Cross-Sector Review of Drivers and Available 3Rs Approaches for Acute Systemic Toxicity Testing

Troy Seidle,*†¹ Sally Robinson,‡¹ Tom Holmes,§² Stuart Creton,¶¹ Pilar Prieto,||¹ Julia Scheel,|||¹ and Magda Chlebus|||¹

**Research & Toxicology Department, Humane Society International, B-1030 Brussels, Belgium; †CAAT Europe, Universität Konstanz/CAAT-Europe, 78464 Konstanz, Germany; ‡Safety Assessment UK, AstraZeneca R&D, Cheshire, SK10 4TG, United Kingdom; §Covance Laboratories Ltd, Harrogate, North Yorkshire HG3 1PY, United Kingdom; ¶National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, W1B 1AL, United Kingdom; ||In Vitro Methods Unit, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Institute for Health and Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, 21010 Ispra (Varese), Italy; |||Corporate Product Safety, Henkel AG & Co. KGaA, 40191 Dusseldorf, Germany; and ||||CEE Region Affairs & Animal Welfare, European Federation of Pharmaceutical Industries and Federations, 1050 Brussels, Belgium*



EPAA Workshop: Acute Toxicity Testing Across Sectors – 16
September 2010

Silken Berlaymont Hotel, Brussels

Disponible en:

<http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/>



Línea de trabajo 1: Promover en Europa y a nivel global el prescindir de la vía dérmica.



Concordancia entre las vías oral y dérmica

Químicos (1569)	VIA ORAL			
VIA DERMICA	NC	Xn	T	T+
NC	1460	88	9	1
Xn	0	10	0	0
T	0	1	0	0
T+	0	0	0	0

- Concordancia global 93.7%
- 0.06% vía dérmica más severa (1 sustancia)
- 6.2% vía oral más severa (98 sustancias)

Seidle et al., 2009, Examining the regulatory value of multi-route mammalian acute systemic toxicity studies. ALTEX 28, 2/11:95-102.

Pesticidas (337)	VIA ORAL				
VIA DERMICA	NC	4	3	2	1
NC	154	96	32	2	2
4	0	6	4	2	0
3	1	1	9	6	2
2	0	0	3	4	2
1	0	0	0	1	10

- Concordancia global 54%
- 1.8% vía dérmica más severa (6 sustancias)
- 43.9% vía oral más severa (148 sustancias)

Conclusiones de éste y otros análisis similares

Creton et al., 2010, Critical Reviews in Toxicology 40(1), 50-83; Thomas & Dewhurst, 2007, Abstract Toxicology 231: 114-115; Andrew & Wright-Williams, 2011, TSGE poster presented at Autumn meeting of the British Toxicology Society

- En general la toxicidad de las sustancias químicas es mayor por vía oral que por vía dérmica.
- El infra estimar la toxicidad cutánea de sustancias con la vía oral se puede evitar usando información adicional.
- Existen dudas sobre la necesidad de incluir por defecto el test de toxicidad dérmica aguda en el paquete de información mínima necesaria para la evaluación de seguridad y para clasificar y etiquetar sustancias.
- Los test por vía dérmica son supérfluos en el caso de sustancias no clasificadas por vía oral.



Progreso técnico

Nueva Regulación Europa sobre Biocidas:

(Anexo II, 8.7 Información requerida (toxicidad aguda):

- **por vía oral** *el método de las clases de toxicidad aguda es el método de preferencia*
- Ensayos por **otras vías** necesarios sólo si se cumplen criterios específicos
- *“Antes de realizar un nuevo estudio de toxicidad aguda **por vía cutánea**, debe llevarse a cabo un ensayo in vitro de penetración cutánea (OCDE 428) con el fin de evaluar la magnitud y el índice de biodisponibilidad cutánea probables”.*
- Es necesario realizar el ensayo por **vía cutánea** sólo si *“es improbable la inhalación de la sustancia; es probable el contacto con la piel durante producción y uso; y las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas indican la posibilidad de una tasa de absorción significativa a través de la piel; o bien los resultados de un estudio in vitro sobre la penetración cutánea (OCDE 428) muestran un alto nivel de absorción y biodisponibilidad cutáneas”.*

Se está revisando de la información requerida en Europa para sustancias agroquímicas