



THE EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY  
FOR ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING

# Aproximaciones alternativas en toxicidad aguda

Pilar Prieto

[www.jrc.ec.europa.eu](http://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: <b>Dosis Fija</b> (5-7 animales)	OECD TG 402: <b>LD<sub>50</sub> Clásica</b> (10-30 animales)	OECD TG 403: <b>LC<sub>50</sub> Clásica</b> (40-80 animales)
OECD TG 423: <b>Clase Tóxica Aguda</b> (6-7 animales)		OECD TG 436: <b>Clase Tóxica Aguda</b> (6-9 animales)
OECD TG 425: <b>Arriba y Abajo</b> (5-9 animales)		

Utilidad principal: **Clasificar y etiquetar** sustancias (con los valores de **LD<sub>50</sub>** o **LC<sub>50</sub>** que definen los límites de las categorías de toxicidad aguda)



# Marco Regulatorio

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



# Mecanismos de acción

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

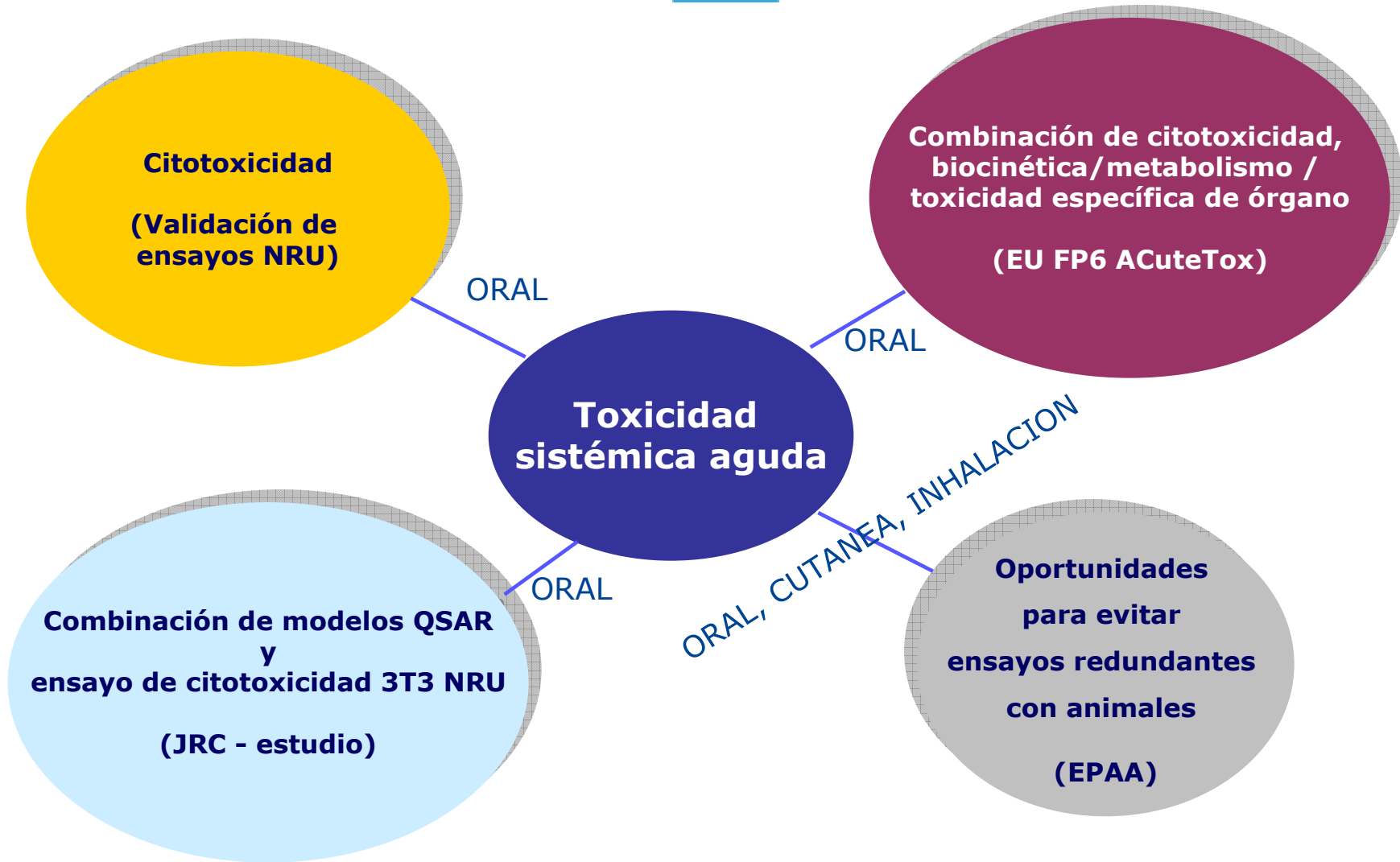
(2) ICCVAM-NICEATM/ECVAM, JaCVAM Workshop Report on Acute Chemical Safety Testing. NIH, 2009.

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

- Buena correlación entre toxicidad sistémica *in vivo* (LD<sub>50</sub>) y citotoxicidad *in vitro* (IC<sub>50</sub>).
- ¿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**





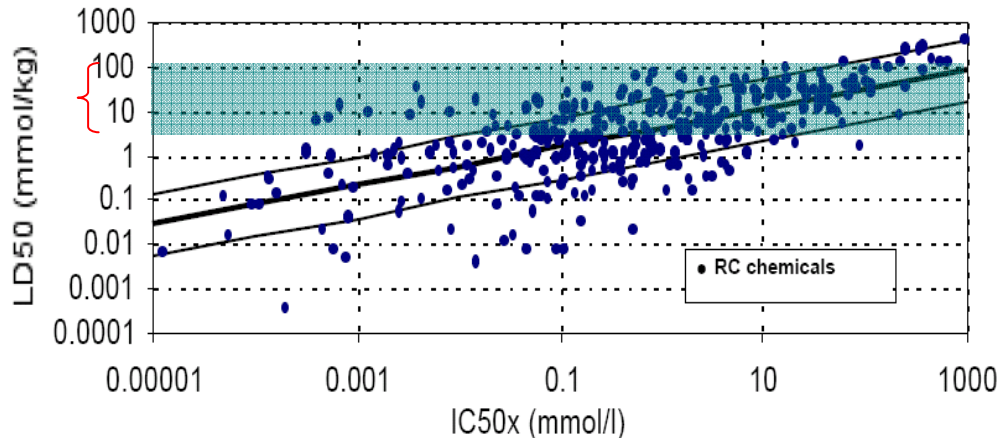
Estudio de validación para evaluar la **capacidad predictiva** del **test de citotoxicidad *in vitro* de incorporación del rojo neutro en células 3T3 para identificar sustancias que no requieren clasificación** para la toxicidad oral aguda (**LD<sub>50</sub> > 2000 mg/kg b.w.**)

*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: $LD_{50} < 5$	<b>0.05%</b>
Category 2: $5 < LD_{50} \leq 50$	<b>0.31%</b>
Category 3: $50 < LD_{50} \leq 300$	<b>3.41%</b>
Category 4: $300 < LD_{50} \leq 2000$	<b>9.39%</b>
Category 5: $2000 < LD_{50} \leq 5000$	<b>70.16%</b>
Not classified: $LD_{50} > 5000$	<b>16.69%</b>

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

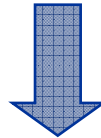
**EU CLP: No clasificada**

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

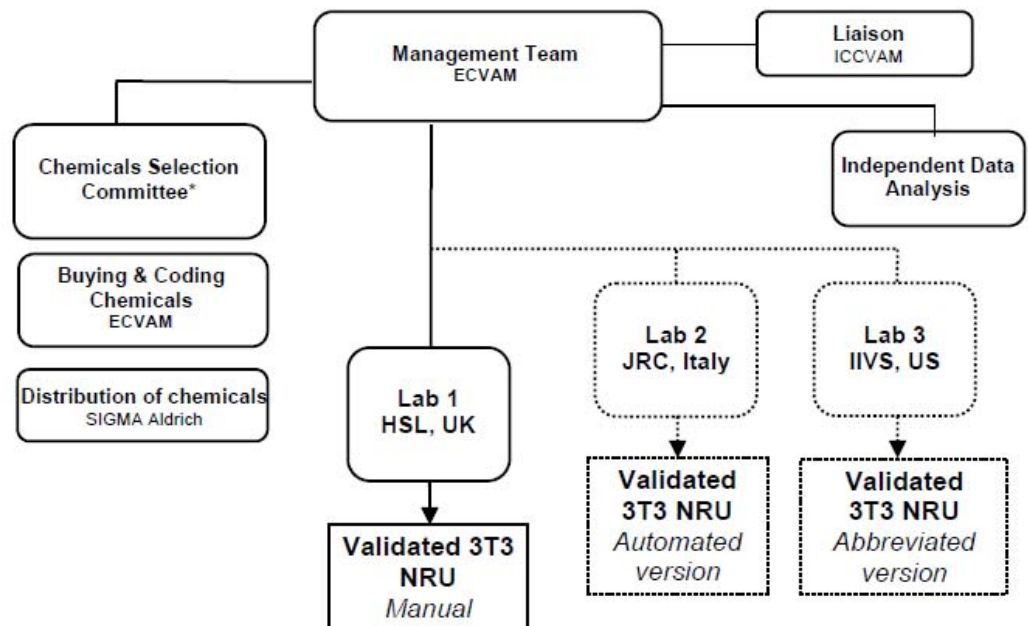


El uso de este método de ensayo podría reducir potencialmente los ensayos *in vivo* de toxicidad oral aguda si se utiliza en una estrategia integrada, o como apoyo de estrategias de aproximación o peso de la evidencia para identificar sustancias no clasificadas

# 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 **LD<sub>50</sub> > 2000 mg/kg**)

Protocolo y modelos de regresión IC<sub>50</sub>-LD<sub>50</sub> 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 LD<sub>50</sub> de 2000 mg/kg b.w.

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

# Análisis de datos

## 1. Estimación de LD<sub>50</sub> a partir de valores de IC<sub>50</sub>:

- "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

<b>Reproducibilidad intralaboratorio</b>	
"Millimole regression"	94% - 100%
"Weight regression"	93% - 98%

## "Millimole regression"

<b>Reproducibilidad entre protocolos</b>	
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)

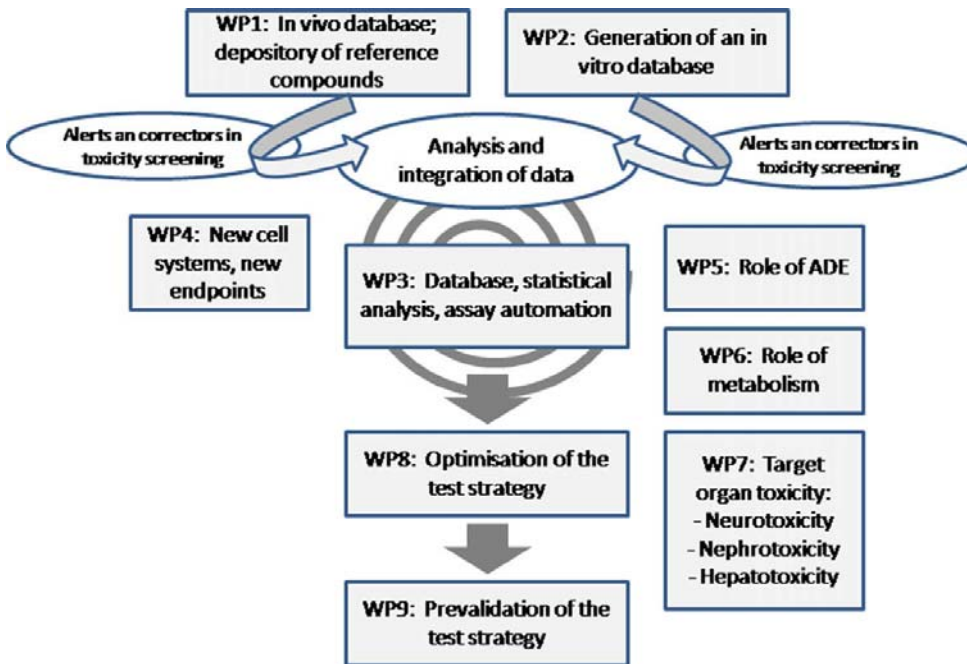


# Conclusiones

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).



Research Project for Alternative Testing



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

## 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.**



# 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,\*†<sup>1</sup> Sally Robinson,‡<sup>1</sup> Tom Holmes,§<sup>2</sup> Stuart Creton,¶<sup>1</sup> Pilar Prieto,||<sup>1</sup> Julia Scheel,|||<sup>1</sup> and Magda Chlebus|||<sup>1</sup>

\*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

Disponibile 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**