

V Jornada REMA
5-abril-2011



Validación y aceptación de métodos alternativos por las agencias reguladoras

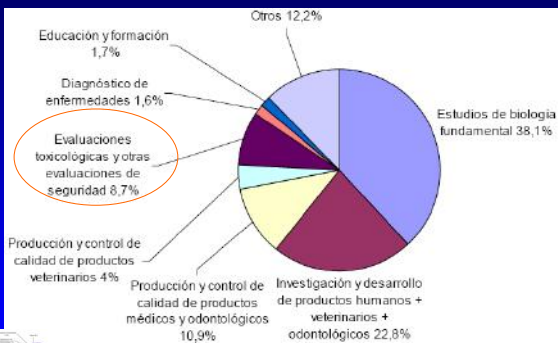
Guillermo Repetto

[Http://buscaalternativas.com](http://buscaalternativas.com)



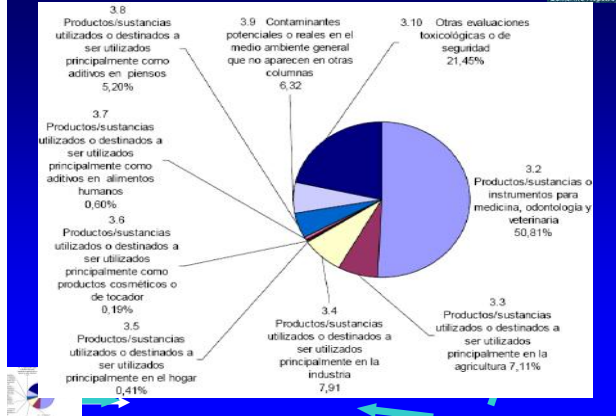
Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal

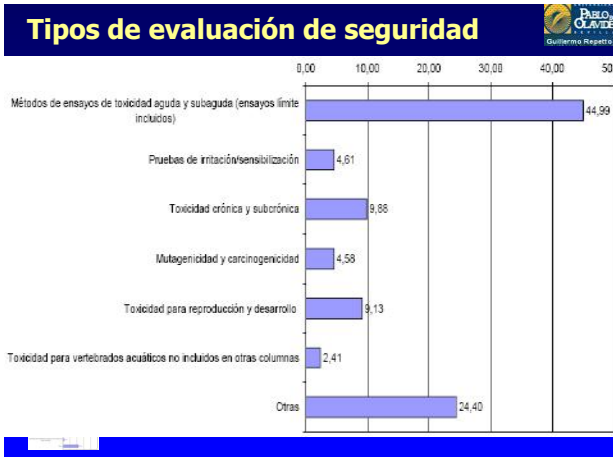
Finalidad: Animales de experimentación UE



12 millones / año según 6º Informe Europeo 2010

@ Según tipo de evaluación de seguridad (8.7%)





Métodos Alternativos (3Rs):

todo procedimiento que permita:

- REFINAR un método para disminuir el estrés y el sufrimiento de los animales
- REDUCIR el número de animales
- REEMPLAZAR el uso de animales

(Russell & Burch, 1959)

+ Responsabilidad

Alternativas I

- Evitar la repetición innecesaria de experimentos *in vivo* e *in vitro*: Protocolos y estudios previos. Disponibilidad de la información, intercambio. Flexibilidad. Estrategias integradas
- Modelos Computarizados de Predicción: *in silico*
 - Cinética ambiental de compuestos químicos
 - Farmacotoxicocinética (PB-PK)
 - Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR)
- Mejoras en el diseño de estudios animales:
 - Reducción: número de animales usados
 - Refinamiento: minimización del dolor y distres; nuevos modelos
- Uso de organismos inferiores no protegidos:
 - Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, animales invertebrados

Alternativas II

5. Vertebrados en etapas iniciales de desarrollo:
Peces, anfibios, reptiles, pájaros, mamíferos

6. Métodos *In vitro* :

- Organos: baños, perfusión, cultivo, cortes, órganos reconstituidos
- Explantes, reagregados celulares, micromasas, cocultivos
- Cultivo primario de células dispersadas
- Líneas celulares / transgénesis
- Sistemas libres de células

7. Otros:

- 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 *et al.*, 1998)

Bioindicadores *in vitro*

- Morfología celular y tisular: Forma, tamaño, diferenciación, organelas
- Viabilidad Celular: Captación de colorantes, adhesión, fagocitosis
- Proliferación Celular: Proteínas, DNA, ciclo celular
- Actividad Metabólica: Sustancias Reguladoras
- Citoesqueleto / Membranas: Uso de energía, enzimas, pH, biolum. calor. Síntesis de Macromoléculas
- Señalización celular: Composición y estabilidad
- Ácidos Nucleicos: Permeabilidad iónica / Sistem de Transporte
- Sistem. Biotransformación: GJIC, citoquinas, NO
- Sistemas Defensivos: Expresión génica / inhibición
- Indicadores Específicos: Mutación / degradación / apoptosis

➔ **Genómica- Proteómica- Metabolómica- Citómica**

Procedimiento básico

CULTIVO

MANTENIMIENTO

SIEMBRA DE PLACAS

APLICACIÓN DE REACTIVOS

LECTURA DE PLACAS

CUANTIFICACIÓN

Apoptosis visualizada mediante:

Hematoxilina eosina TUNEL

Fluorescencia Electroforesis en Gel en agarosa

Métodos *in vivo* e *in vitro*: complementarios

*“En muchas áreas biomédicas, los métodos experimentales *in vitro* son cada vez más utilizados como métodos de elección en vez de estudios animales, no porque suministren la misma información, sino porque suponen la mejor aproximación científica a los problemas estudiados”*

(Balls et al., 1995)

Inventory of Spanish Instit..(Repetto et al., 1999)

Year	Animals	Alternatives	Humans
69-70	220	50	10
71-75	280	80	15
76-80	300	100	20
81-85	320	150	25
86-90	350	200	30
91-95	250	180	25
96-98	200	150	20

Conceptos básicos:

- La validación es el proceso por el que se establece la reproducibilidad y relevancia de un procedimiento para un determinado propósito
- La aceptación por las autoridades reguladoras de un procedimiento consiste en su inclusión entre los ensayos admitidos en la valoración del riesgo

Etapas en la evolución de ensayos, según su finalidad

1.- Desarrollo del ensayo [Lab de origen]

- Definir Finalidad del ensayo, Utilidad del ensayo, Diseño del método,
- Aplicación de compuestos apropiados (estudio intralaboratorio)
- Consideración de su validación
- Preparación del protocolo

2.- Prevalidación: reproducibilidad

- Fase I: Refinamiento L 1 "Laboratorio líder"
- Fase II: Transferencia L 1 y 2
- Fase III: Funcionamiento L 1, 2, y 3

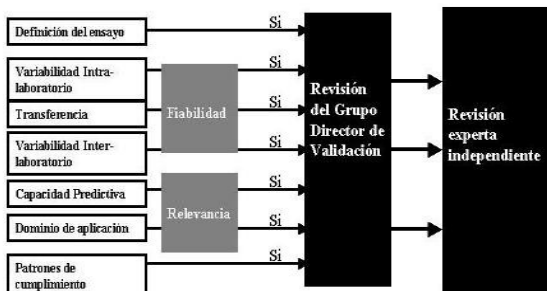
3.- VALIDACIÓN científica (estudio definitivo interlab):
relevancia

- 3.1.- Diseño del estudio, selección de los ensayos, los laboratorios y los compuestos [Equipo de dirección]
- 3.2.- Codificado y distribución de los compuestos [L independiente]
- 3.3.- Ensayo [L participantes]
- 3.4.- Recogido de los datos [L participantes]
- 3.5.- Análisis de los datos [Analista independiente]
- 3.6.- Evaluación del resultado [Equipo de dirección]

4.- Evaluación del estudio y emisión de propuesta
[Grupo de expertos independientes, Ej, ESAC]

5.- ACEPTACIÓN reguladora [OECD, UE, organismos nacionales]

Aproximación modular a la validación




Un "sí" indica que la información requerida para cada módulo es la adecuada para entrar en el proceso de revisión independiente. Los siete módulos deben estar satisfactoriamente completados, según el criterio del Grupo Director de Validación, antes de que un método pueda entrar en el proceso de revisión independiente.

Traducida de) original en inglés Hartung y col 2004

Tipos de validación:


- Validación prospectiva
- Sistema modular: flexibiliza al proceso de validación mediante 7 módulos independientes, cuya información puede obtenerse de modo prospectivo, retrospectivo o combinado
- Validación catch-up o de emparejamiento: se comparan los criterios estructurales y de funcionamiento de un método con otro similar ya validado y aceptado.
- Mediante el peso de la evidencia, evaluación retrospectiva del estado de validación o validación retrospectiva.

Problema: el procedimiento de referencia






Guillermo Repetto


**Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing:
Current Status and Future Prospects - 2010**

Sarah Adler¹, David Basketter², Stuart Creton³, Olavi Pelkonen⁴, Jan van Benneim⁵, Valerie Zuanzi⁶, Klaus Ejner Andersen⁷, Alexandre Angers-Loustau⁸, Aymur Aptula⁹, Anna Bal-Prax¹⁰, Emilio Benfenati¹¹, Ulrike Bernauer¹², Jos Bessems¹³, Frederic Bois¹⁴, Alan Boobis¹⁵, Esther Brandon¹⁶, Susanne Bremer¹⁷, Thomas Broschard¹⁸, Silvia Casati¹⁹, Sandra Coecke²⁰, Raffaella Corvi²¹, Mark Cronin²², George Daston²³, Wolfgang Dekant²⁴, Susan Felton²⁵, Elise Grignard²⁶, Ursula Gundert-Renny²⁷, Tula Heinonen²⁸, Ian Kimber²⁹, Jos Kleinjans³⁰, Hannu Komulainen³¹, Reinhard Kreiling³², Joachim Kreysa³³, Paolo Mazzatorta³⁴, Gavin Maxwell³⁵, Sharon Munn³⁶, Sofia Batista Leite^{37,38}, George Loizou³⁹, Stefan Pföhler⁴⁰, Pascal Phrakonkham⁴¹, Aldert Piessens⁴², Albrecht Poth⁴³, Pilar Prieto⁴⁴, **Guillermo Repetto**⁴⁵, Vera Rogiers⁴⁶, Greet Schoeters⁴⁷, Michael Schwartz⁴⁸, Rositsa Serafimova⁴⁹, Hama Taliti⁵⁰, Emanuela Testa⁵¹, Joost van Delft⁵², Henk van Loveren^{53,54}, Mathieu Vunken⁵⁵, Andrew Worth⁵⁶, José-Manuel Zaldivar⁵⁷


Guillermo Repetto

Toxicidad aguda *in vivo*: Reducción y Refinamiento

- Método Clásico (TG 401, B1, eliminada 2001) 
- Método de la Dosis Fijada FDP (TG 420, 2001; B1bis, 2004) 
- Método de la Clase Tóxica Aguda ATC (TG 423, B1tris) 
- Método Arriba y Abajo UD (TG 425, 2001; Agencias US, 2003) 
- Ensayo *in vitro* para seleccionar la dosis de inicio *in vivo* (ICCVAM 2006; Rec Ag US, 2008)


Guillermo Repetto

Conclusiones:

- Menos del 10% de los animales de experimentación se emplean por requerimientos reguladores
- La validación y aceptación de nuevos métodos requiere unos 10 años. Para tratar de acelerarlo se han desarrollado nuevas estrategias.
- Procedimientos *in vitro* aceptados:
 - 15 ensayos de toxicidad (corrosividad dérmica, irritación dérmica, irritación severa / corrosividad ocular y fototoxicidad)
 - 1 de toxicocinética (absorción dérmica)
 - 5 de pirogenicidad
 - 3 para vacunas,
 - +10 de mutagenicidad (previamente)
- Se esperan más aceptaciones que reduzcan aún más el empleo de animales.

ema Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal
www.remanet.net

Inicio | **REMA** | ENTIDADES | NOTICIAS | CURSOS | ACTIVIDADES | ENLACES | INSCRIPCIÓN | ENGLISH

¿POR QUÉ EXISTE?
¿QUÉ ES?
OBJETIVOS
CONSTITUCIÓN
ORGANIZACIÓN
MIEMBRO FUNDADOR DE ECDPA
JUNTA DIRECTIVA
ENTIDADES Y SOCIEDADES ADHERIDAS

REMA =
Admón +
Industria +
Ciencia +
Sociedad

Contacto
Coordinador: Guillermo Rojas, Erika Jara Estévez
REMA.2007

Logos of member organizations: GTEMA, ae, tox, SEBBM, GELLEC, SERG, SEN, SENSA, COBCM, adda, AEBI, ANDA, Almirall, ANFAGO, ESTEVE, Farmaindustria, CSIC, P&G, PROVITAL, stanpa, Basi, SA, INIA, Fundación, neuropharma, Veterindustria, teiQue, Fundación Alive, Tecnología Agraria e Alimentaria.
