

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 31 Número 2 (2014)

SEMESTRAL

Monograph on alternative approaches to animal experimentation
INDEX

Editorial	103
León P, Dignoes O. Alternative methods: a challenge for governments and scientists.	105
Repetto G, Álvarez Herrera C, del Peso A. Strategies for the identification of alternative approaches to animal experimentation. de la Peña de Torres, E. Advocacy and outreach on alternatives in Spain.	108
Villamayor, F. Reduction of the number of animals in experiments and sample size calculation: a five-legged table.	115
Vinardell MP. Alternatives to laboratory animals in education.	121
Alejandro A, Garcia-Bilbao A, Aristimuño C. Progresses in the skin sensitization assessment using alternative methods.	124
de Lapuente J, Borrás M, González-Linares J, Llanas H, Mitjans M, Ramos-López D y Vinardell P. Alternative methods in the study of the safety of cosmetics.	130
Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs.	140
Gozalbes R, de Julián-Ortiz JV, Fito-López C. Computational methods in predictive toxicology: application to the reduction of animal tests in the context of the REACH UE regulation.	149
Castañeda-Casado P, Gresham S, Jimenez-Navarro E, Giddings A, Muñoz-Muriedas J, Hattotuwigama C, Harvey J, Robinson S. Multiple <i>in silico</i> genetic toxicity alerting tools for antimalarial compounds prioritization.	157
Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Peropadre A, Hazen MJ. Cytotoxic evaluation of a mixture of eight pollutants at environmental relevant concentrations.	168
Herrero O, Planelló R, Gómez-Sande P, Aquilino M, Morcillo G. Evaluation of the toxic effects of phthalates on natural populations of <i>Chironomus riparius</i> (Diptera): implications for ecotoxicity studies.	172
Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz MJ. Cytotoxic and interactive effects of zearalenone, α-zearalenol and β-zearalenol and formation of metabolites in HepG2 cells.	176
Juan-García A, Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ. Toxic effects of alternariol by <i>in vitro</i> assays: a review.	187

Monográfico sobre planteamientos alternativos a la
experimentación animal

ÍNDICE	
Editorial	103
León P, Dignoes O. Los métodos alternativos: un reto para las administraciones y para los científicos.	105
Repetto G, Álvarez Herrera C, del Peso A. Estrategias de identificación de planteamientos alternativos a la experimentación animal. de la Peña de Torres, E. Actividades de promoción y difusión de alternativas en España.	108
Villamayor, F. La reducción del número de animales de experimentación y el cálculo del tamaño muestral: una mesa con cinco patas.	115
Vinardell MP. Alternativas a los animales de laboratorio en la docencia.	121
Alejandro A, Garcia-Bilbao A, Aristimuño C. Avances en la evaluación de la sensibilización dérmica mediante métodos alternativos. de Lapuente J, Borrás M, González-Linares J, Llanas H, Mitjans M, Ramos-López D y Vinardell P. Los métodos alternativos en el estudio de la seguridad de cosméticos.	124
Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Modelos celulares para predecir la hepatotoxicidad humana de fármacos.	130
Gozalbes R, de Julián-Ortiz JV, Fito-López C. Métodos computacionales en toxicología predictiva: aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH.	140
Castañeda-Casado P, Gresham S, Jimenez-Navarro E, Giddings A, Muñoz-Muriedas J, Hattotuwigama C, Harvey J, Robinson S. Aplicación de un sistema <i>in silico</i> múltiple para la priorización en la selección de compuestos antimaláricos.	149
Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Peropadre A, Hazen MJ. Evaluación de la citotoxicidad de una mezcla de ocho contaminantes a concentraciones de relevancia ambiental.	157
Herrero O, Planelló R, Gómez-Sande P, Aquilino M, Morcillo G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de <i>Chironomus riparius</i> (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad.	168
Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz MJ. Citotoxicidad, formación de metabolitos e interacción entre zearalenona, α- zearalenol y β-zearalenol en células HepG2.	172
Juan-García A, Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ. Efectos tóxicos de alternariol por ensayos <i>in vitro</i>: revisión.	176

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECs, ICYT, IME, EMBASE/Excerpta Medica y Chemical Abstracts
Indexed in Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECs, ICYT, IME, EMBASE/Excerpta Medica and Chemical Abstracts



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 31 (2) 103-204 2014
ISSN 0212-7113

e-revist@s

<http://www.aetox.es>

La **Revista de Toxicología** pretende ofrecer a sus lectores (científicos, docentes, profesionales y estudiosos) información actualizada sobre los avances más recientes en Toxicología. Dedicamos especial atención a los estudios relacionados con los efectos de las sustancias químicas y los mecanismos de toxicidad, mediante ensayos en animales de experimentación, métodos alternativos *in vitro* y estudios en humanos. También incluye estudios sobre nuevas sustancias y técnicas analíticas. Otro aspecto importante de la revista son los artículos de revisión, especialmente en temas de Toxicología Fundamental, Toxicología Clínica, Genotoxicología, Toxicología Ambiental, etc.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Resumen actual de características y normativas

El objetivo fundamental de la Asociación Española de Toxicología es el de propiciar la relación y cooperación entre sus miembros, y coordinar sus esfuerzos a fin de contribuir al desarrollo y difusión de los conocimientos en las diferentes áreas de la toxicología. Su Estatuto fundacional fue aprobado oficialmente el 15 de enero de 1980.

Toda persona interesada en pertenecer a esta Asociación deberá cumplimentar una ficha de inscripción, refrendada por la Junta Directiva. La cuota anual (60 €) se abona por domiciliación bancaria. Esta cuota da derecho a la recepción de la "Revista de Toxicología". Una vez admitidos los nuevos asociados recibirán un título y, periódicamente, las actas de las reuniones y comunicación de actividades con carácter nacional e internacional que pueden ser de interés.

La asociación promueve la celebración, cada dos años, del Congreso Español de Toxicología, cuya organización puede delegar. Además se ha establecido la celebración periódica de seminarios o mesas redondas organizados por grupos de trabajo. Cada reunión de este tipo será monotemática y abierta a personas no pertenecientes a la Asociación, y se desarrollará en diferentes ciudades españolas.

La Asociación organiza también programas de control de calidad en Toxicología Analítica.

Asociación Española de Toxicología

Secretaría de la AETOX
Emma Martín López
Área de Toxicología
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
Tel: 868 88 7022 / 9311
e-mail: emmaml@um.es

Copyright

El envío de un manuscrito implica: que no ha sido publicado anteriormente (excepto como abstract, o como parte de una conferencia, revisión tesis); que no está considerándose su publicación en otra revista, libro, etc.; que su publicación ha sido aprobada por todos los coautores, si los hay; que, cuando y si el manuscrito es aceptado para su publicación, los autores están de acuerdo en la cesión automática del Copyright a la editorial y que el manuscrito no será publicado en ninguna otra parte ni en ningún otro idioma sin permiso de la editorial.

Todos los artículos publicados en esta revista están protegidos por Copyright, que cubre los derechos exclusivos de reproducción y distribución del artículo (p. ej. como separatas) y también los derechos de traducción. Ningún contenido de la revista puede ser reproducido, fotocopiado, microfilmado o almacenado en bases de datos electrónicas, videodiscos, etc., sin el permiso escrito de los titulares del Copyright.

El uso de nombres descriptivos, de marcas, marcas registradas, etc., incluso si no se identifican especialmente, no implica que estos nombres no estén protegidos por las leyes y regulaciones correspondientes.

Aunque la información en esta revista se considera exacta y verdadera en la fecha de publicación, ni la editorial, ni el director de la revista, ni los autores pueden aceptar ninguna responsabilidad legal por errores u omisiones que puedan acaecer.

Los manuscritos se enviarán a través de la dirección:
<http://ojs.diffundit.com/index.php/revtoxicol>

Para otras cuestiones puede contactarse con:
Prof. Guillermo Repetto. Editor de la Revista de Toxicología.
Universidad Pablo de Olavide.
Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica.
Ctra. de Utrera, km. 1. 41013 - Sevilla, España.
E-mail: revista/aetox.es

D.L.: CO-723-83.
S.V.: 91051 R.
ISSN: 0212-7113

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 31 Número 2 (2014)

SEMESTRAL

Monograph on alternative approaches to animal experimentation
INDEX

Editorial	103
León P, Dignoes O. Alternative methods: a challenge for governments and scientists.	105
Repetto G, Álvarez Herrera C, del Peso A. Strategies for the identification of alternative approaches to animal experimentation.	108
de la Peña de Torres, E. Advocacy and outreach on alternatives in Spain.	115
Villamayor, F. Reduction of the number of animals in experiments and sample size calculation: a five-legged table.	121
Vinardell MP. Alternatives to laboratory animals in education.	124
Alejandro A, Garcia-Bilbao A, Aristimuño C. Progresses in the skin sensitization assessment using alternative methods.	130
de Lapuente J, Borras M, González-Linares J, Llanas H, Mitjans M, Ramos-López D y Vinardell P. Alternative methods in the study of the safety of cosmetics.	140
Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs.	149
Gozalbes R, de Julián-Ortiz JV, Fito-López C. Computational methods in predictive toxicology: application to the reduction of animal tests in the context of the REACH UE regulation.	157
Castañeda-Casado P, Gresham S, Jimenez-Navarro E, Giddings A, Muñoz-Muriedas J, Hattotuwigama C, Harvey J, Robinson S. Multiple <i>in silico</i> genetic toxicity alerting tools for antimalarial compounds prioritization.	168
Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Peropadre A, Hazen MJ. Cytotoxic evaluation of a mixture of eight pollutants at environmental relevant concentrations.	172
Herrero O, Planelló R, Gómez-Sande P, Aquilino M, Morcillo G. Evaluation of the toxic effects of phthalates on natural populations of <i>Chironomus riparius</i> (Diptera): implications for ecotoxicity studies.	176
Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz MJ. Cytotoxic and interactive effects of zearalenone, α-zearalenol and β-zearalenol and formation of metabolites in HepG2 cells.	187
Juan-García A, Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ. Toxic effects of alternariol by <i>in vitro</i> assays: a review.	196

Monográfico sobre planteamientos alternativos a la
experimentación animal

ÍNDICE	
Editorial	103
León P, Dignoes O. Los métodos alternativos: un reto para las administraciones y para los científicos.	105
Repetto G, Álvarez Herrera C, del Peso A. Estrategias de identificación de planteamientos alternativos a la experimentación animal.	108
de la Peña de Torres, E. Actividades de promoción y difusión de alternativas en España.	115
Villamayor, F. La reducción del número de animales de experimentación y el cálculo del tamaño muestral: una mesa con cinco patas.	121
Vinardell MP. Alternativas a los animales de laboratorio en la docencia.	124
Alejandro A, Garcia-Bilbao A, Aristimuño C. Avances en la evaluación de la sensibilización dérmica mediante métodos alternativos.	130
de Lapuente J, Borras M, González-Linares J, Llanas H, Mitjans M, Ramos-López D y Vinardell P. Los métodos alternativos en el estudio de la seguridad de cosméticos.	140
Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Modelos celulares para predecir la hepatotoxicidad humana de fármacos.	149
Gozalbes R, de Julián-Ortiz JV, Fito-López C. Métodos computacionales en toxicología predictiva: aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH.	157
Castañeda-Casado P, Gresham S, Jimenez-Navarro E, Giddings A, Muñoz-Muriedas J, Hattotuwigama C, Harvey J, Robinson S. Aplicación de un sistema <i>in silico</i> múltiple para la priorización en la selección de compuestos antimaláricos.	168
Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Peropadre A, Hazen MJ. Evaluación de la citotoxicidad de una mezcla de ocho contaminantes a concentraciones de relevancia ambiental.	172
Herrero O, Planelló R, Gómez-Sande P, Aquilino M, Morcillo G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de <i>Chironomus riparius</i> (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad.	176
Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz MJ. Citotoxicidad, formación de metabolitos e interacción entre zearalenona, α- zearalenol y β-zearalenol en células HepG2.	187
Juan-García A, Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ. Efectos tóxicos de alternariol por ensayos <i>in vitro</i>: revisión.	196

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECs, ICYT, IME, EMBASE/Excerpta Medica y Chemical Abstracts
Indexed in Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECs, ICYT, IME, EMBASE/Excerpta Medica and Chemical Abstracts



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 31 (2) 103-204 2014
ISSN 0212-7113

e-revist@s

<http://www.aetox.es>

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

COMITÉ DE REDACCIÓN

Editor

Dr. GUILLERMO REPETTO KUHN
Universidad Pablo de Olavide. SEVILLA
E-mail: grepkuh@upo.es

Editoras Adjuntas

Dra. M^a DEL PRADO MÍGUEZ SANTIYÁN
Universidad de Extremadura. CÁCERES
E-mail: prado.miguez@gmail.com

Dra. M^a JOSÉ GONZÁLEZ MUÑOZ
Universidad de Alcalá. MADRID
E-mail: mariajose.gonzalez@uah.es

Comité Editorial

Dr. RAFAEL BALAÑA FAUCE
Universidad de León. LEÓN
E-mail: rbalf@unileon.es

Dra. HOUDA BERRADA RAMDAMI
Universidad de Valencia. VALENCIA
E-mail: houda.berrada@uv.es

Dr. ANGEL TOMÁS CAMACHO GARCÍA
Laboratorios Lema & Bandín. VIGO
E-mail: atcamacho@lemabandin.com

Dra. ANA MARÍA CAMEÁN FERNÁNDEZ
Universidad de Sevilla. SEVILLA
E-mail: camean@us.es

Dr. ANTONIO JUAN GARCÍA FERNÁNDEZ
Universidad de Murcia. MURCIA
E-mail: ajgf@um.es

Dr. FERNANDO GIL HERNÁNDEZ
Universidad de Granada. GRANADA
E-mail: fgil@ugr.es

Dr. DIEGO GONZÁLEZ MACHÍN
CEPIS/OPS. LIMA (PERÚ)
E-mail: dgonzale@cepis.ops-oms.org

Dr. CARLOS GOTELLI

Centro de Investigaciones Toxicológicas
BUENOS AIRES (ARGENTINA)
E-mail: dgotelli@impsatl.com.ar

Dr. ARTURO HARDISSON DE LA TORRE
Universidad de La Laguna. TENERIFE
E-mail: atorre@ull.es

Dra. ÁNGELES JOS GALLEGO
Universidad de Sevilla. SEVILLA
E-mail: angelesjos@us.es

Dra. M^a ARÁNZAZU MARTÍNEZ CABALLERO
Universidad Complutense de Madrid. MADRID
E-mail: arantxam@vet.ucm.es

Dra. EMMA MARTÍNEZ LÓPEZ
Universidad de Murcia. MURCIA
E-mail: emmaml@um.es

Dr. JUAN CARLOS RÍOS BUSTAMANTE
Pontificia Universidad Católica. CHILE
E-mail: jcrios@MED.PUC.CL

Dr. JOSÉ RUEFF
Universidad Libre de Lisboa.
LISBOA (PORTUGAL)
E-mail: rueff.gene@fcm.unl.pt

Dra. MARÍA JOSÉ RUIZ LEAL
Universidad de Valencia. VALENCIA
E-mail: m.jose.ruiz@uv.es

Dra. MARÍA LUISA SORIA SÁNCHEZ
Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.
SEVILLA
E-mail: luisa.soria@mju.es

Dra. MARÍA JESÚS TABERNERO DUQUE
Universidad de Santiago de Compostela. LA CORUÑA
E-mail: mj.tabernero@usc.es

EDITORIAL

Monográfico sobre Planteamientos Alternativos a la Experimentación Animal

El presente número de la Revista de Toxicología contiene un monográfico dedicado a la promoción y difusión de los métodos alternativos a la experimentación animal. La Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos ha supuesto un paso hacia adelante en la promoción de planteamientos alternativos a los animales de experimentación, como lo demuestra que el 25% de sus considerandos abordan, directa o indirectamente, el principio de las tres erres.

Los responsables del Punto Nacional de contacto español sobre alternativas clarifican, en el primer artículo de este número, que los métodos alternativos no son solo aquellos que alcanzan el Reemplazo total de los animales, sino que también comprenden otros métodos y estrategias en las que se reduce el número de animales utilizados (Reducción) o se refinan las condiciones en los que éstos se utilizan y mantienen (Refinamiento).

En este sentido resulta necesario conocer las estrategias de identificación de planteamientos alternativos a la experimentación animal y se revisan las actividades de difusión y promoción de alternativas realizadas en España.

Se incluye una revisión sobre la utilización de animales y de métodos alternativos en docencia y se constata que todavía se siguen utilizando animales, a pesar de los avances tecnológicos que permiten cada vez métodos mejores y más efectivos para reemplazar a los animales en las prácticas docentes.

EURL-ECVAM recomienda incorporar en la estrategia de evaluación de la sensibilización dérmica a tres métodos *in vitro*, el ensayo directo de reactividad peptídica (DPRA), el ensayo KeratinoSens™ y el ensayo de activación de la estirpe celular humana (h-CLAT). Son muy numerosos los modelos celulares para predecir la hepatotoxicidad humana de fármacos, en los que se están aplicando nuevos sistemas que reproducen las interacciones entre células, célula-biomatriz y el flujo de nutrientes característicos del microambiente hepático con cultivos 3D, co-cultivos con células no parenquimales y sistemas con microfluídos.

Los métodos computacionales se están mostrando muy útiles en toxicología predictiva, por lo que se presentan aplicaciones a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH, así como aplicaciones concretas en el desarrollo de medicamentos.

Como artículos de investigación se incluyen estudios que muestran una gran variedad de aplicaciones como la evaluación de la citotoxicidad de mezclas de contaminantes en cultivos de células de mono, el empleo de mosquitos y la investigación de la citotoxicidad, formación de metabolitos e interacción entre la zearalenona y sus metabolitos en células hepáticas. Finalmente se revisan los numerosos procedimientos *in vitro* que se han empleado para investigar la toxicidad de la micotoxina alternariol.

Deseamos agradecer que la difusión de la presente monografía haya contado con el apoyo del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente dentro del convenio de colaboración con la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la experimentación animal, para el intercambio de información técnico-científica y la cooperación en materia de alternativas a la utilización de los animales destinados a la experimentación y otros fines científicos.

Por otra parte, una vez concluida la tarea de adaptación de la revista para su gestión electrónica y publicación de artículos también en inglés, deseo ceder el testigo de la edición, no sin antes agradecer a la Profa. Guillermina Font por confiarme esta labor, a las editoras adjuntas Profas. María José González Muñoz y María del Prado Míguez Santiyán por su estrecha colaboración, a los revisores por su anónima ayuda y a los autores por el interés mostrado en publicar en la Revista de Toxicología.

El Editor
Guillermo Repetto
Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla

Los métodos alternativos: un reto para las administraciones y para los científicos

León P*, Dignoes O

Servicio de Bienestar Animal. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

Recibido 3 de octubre de 2014 / Aceptado 3 de noviembre de 2014

Resumen: La normativa actual que regula en el ámbito europeo la utilización de los animales con fines científicos establece con absoluta rotundidad que su prioridad absoluta es el fomento y la implantación de los enfoques alternativos a los métodos tradicionales de utilización de los animales. Insistimos sobre dos aspectos que consideramos relevantes. En primer lugar es necesario aclarar que los métodos alternativos no son solo aquellos en los que se alcanza el Reemplazo total de los animales, sino que también comprenden aquellos otros métodos y estrategias en las que se reduce el número de animales utilizados (Reducción) o se refinan las condiciones en los que éstos se utilizan y mantienen (Refinamiento). En segundo lugar quisiéramos animar a la comunidad científica a dar los pasos que sean necesarios para poder implementar también en el ámbito de las 3 erres el cambio de paradigma que los avances y el desarrollo que en el campo de la biología molecular y de sistemas están haciendo posible en toxicología. En el futuro es posible que algunas pruebas puedan consistir ya no tanto en analizar los efectos que determinadas sustancias tóxicas tienen sobre los animales, sino más bien en evaluar los cambios metabólicos que a nivel molecular son los que realmente causan los mencionados efectos sobre los animales (y lógicamente el ser humano).

Palabras clave: alternativas, enfoques, administraciones, científicos

Abstract: Alternative methods: a challenge for governments and scientists. Current European regulations on the use of animals for scientific purposes categorically states that the first priority is the development and implementation of alternative approaches to traditional methods using animals. We insist on two aspects that we consider relevant. First it is necessary to clarify that alternative methods are not only those in which the total replacement of animals is reached, but also include those other methods and strategies in which the number of animals used decreases (reduction) or refine the conditions under which they are used and maintained (Refinement). Secondly, we would like to encourage the scientific community to take the steps necessary to also implement in the field of the 3Rs principle that progress and development in the field of molecular biology and systems are possible in toxicology. In the future it is possible that some studies may consist not so much as to analyze the effects that certain toxic substances have on the animals, but rather to evaluate metabolic changes at the molecular level that actually cause the effects on animals (and logically on humans).

Key words: alternatives, approaches, governments, scientists

Los métodos alternativos en la legislación de protección animal

La normativa actual que regula en el ámbito europeo la utilización de los animales con fines científicos establece con absoluta rotundidad que su prioridad absoluta es el fomento y la implantación de los *enfoques* alternativos a los métodos tradicionales de utilización de los animales. No es que esta preocupación sea nueva, ya que estaba presente tanto en la anterior directiva comunitaria como en su correspondiente real decreto de transposición [1] al ordenamiento jurídico español, pero sí que es importante resaltar que la voluntad del legislador de impulsar este enfoque está mucho más presente en la normativa actual [2]. Esta evolución jurídica responde, como no podía ser de otra forma, a la creciente concienciación de los ciudadanos europeos de que si bien el uso de animales sigue siendo necesario, el mismo conlleva una responsabilidad moral y ética hacia los animales que se utilizan con estos fines.

Como veremos en las conclusiones de este artículo, en toxicología parece que es especialmente ardua la tarea de implementar los métodos alternativos, ya que la aplicación de los distintos métodos y procedimientos viene impuesta en muchos casos por la normativa y su sustitución solo puede hacerse tras un largo proceso de validación. Sin embargo, también es cierto que el horizonte es prometedor, ya que los avances científicos en biología molecular y de sistemas pueden hacer posible un cambio de paradigma en este campo de la toxicología.

Si analizamos la Directiva 2010/63/UE, simplemente haciendo una valoración numérica las cuentas son fáciles: 14 de los 56 considerandos abordan bien directa, bien indirectamente el principio de las tres erres [3]. Es más, en el considerando 10 se reconoce explícitamente que el objetivo final es el reemplazo total de los animales utilizados con fines científicos y educativos por sistemas que no impliquen el uso de animales vivos, es decir la R de reemplazo aplicada hasta su último extremo.

Entendiendo que ese objetivo final no es alcanzable a corto plazo, la norma establece la aplicación inmediata y estricta de enfoques alternativos (obsérvese que la Directiva habla de *enfoques* y no de métodos, porque alguno de los enfoques alternativos consiste precisamente en evitar la aplicación de métodos con animales). Dentro de estos enfoques, la normativa hace especial hincapié en el principio de las 3 erres. Este principio, enunciado por Russel y Burch, consiste en esencia en aceptar la utilización de animales (mientras ésta sea imprescindible) y avanzar paso a paso, a través de la implementación gradual de los sistemas de reemplazo, reducción y refinamiento hacia el objetivo final de no utilización de animales con fines científicos. Así, el siguiente considerando establece la introducción sistemática de una valoración de las posibilidades de

* e-mail: pilarleon@magrama.es

reemplazo de los animales vivos en los proyectos de investigación, de la reducción del número de animales utilizados tanto como sea posible y, para aquellos casos en que sea imprescindible su utilización, que los procedimientos sean lo menos lesivos que sea posible y que los animales se mantengan en las mejores condiciones y entorno. Por supuesto, siempre que estas medidas no menoscaben la calidad de los resultados de la investigación o de la prueba, ya que en caso contrario el uso de los animales hubiera sido inútil.

Esta declaración de intenciones que constituye los considerandos de la directiva se plasman explícitamente en el articulado tanto de la Directiva como del real decreto que la transpone al ordenamiento jurídico nacional [4]. Con fines únicamente didáctico-organizativo podemos agrupar estos requisitos normativos en cinco apartados:

Obligación de utilizar métodos alternativos

A lo largo de todo el Real Decreto se establece como primer paso la obligatoriedad de valorar la aplicación de las diversas estrategias metodológicas disponibles en el marco del uso de animales. De hecho, no debe realizarse ningún procedimiento para el que exista un método alternativo satisfactorio desde el punto de vista científico. Esta idea viene reforzada incluso por una ordenación jerárquica en la elección de los métodos a utilizar.

Por otra parte, para evitar un derroche innecesario de usos de animales, la norma establece la obligatoriedad de aceptar los datos obtenidos en los demás Estados miembro, siempre que para la obtención de dichos datos se hayan empleado procedimientos reconocidos por la normativa de la Unión. La norma anima igualmente a establecer programas que permitan compartir órganos y tejidos en diferentes proyectos, con el obvio fin de reducir el número de animales utilizados.

Requisitos para los establecimientos, para los proyectos y para el personal

Todos los criadores, suministradores y usuarios de animales están obligados, entre otras cuestiones, a disponer de un órgano encargado del bienestar. Este órgano, que en el caso de los usuarios ha de tomar la forma de comité ético, deberá proporcionar asesoramiento al centro y al personal sobre la aplicación de los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento, sin perjuicio de desarrollo de otras actividades que también corresponden a estos órganos.

Los proyectos, antes de ser autorizados y de iniciarse, deben ser cuidadosamente evaluados, de forma que se garantice que en su diseño se han valorado todas posibilidades que ofrecen las estrategias alternativas. De hecho, y para los proyectos que a priori y en teoría pueden ser más lesivos para los animales (es decir todos aquellos que incluyen procedimientos clasificados como severos), así como para aquellos proyectos que el ciudadano europeo considera especialmente sensibles por utilizar determinados tipos de animales (primates) deben, obligatoriamente ser sometidos además, “a posteriori”, a una evaluación retrospectiva con el ánimo, entre otros aspectos, de permitir, gracias a la experiencia adquirida, una mejor futura aplicación de las tres erres.

Promoción, acceso y diseminación

La normativa enuncia que todas las administraciones públicas, tanto las estatales como las de las comunidades autónomas, debemos fomentar la investigación de los enfoques alternativos y difundir el resultado de estas investigaciones para impulsar y desarrollar nuevos planteamientos alternativos. Sin embargo, nada dice la normativa sobre cómo realizar tal fomento y divulgación de resultados, por lo

que es uno de los retos a los que nos estamos enfrentando las administraciones públicas de toda Europa. Si bien sobre el papel el objetivo a alcanzar es muy claro, las vías para conseguirlo están en fase de diseño, siendo ésta obligación una de las que está siendo abordada por distintos grupos de trabajo a nivel de la Unión Europea.

Transparencia e información

Es evidente que las medidas que se toman tienen mucho más valor cuando son conocidas, de ahí la política de transparencia que impregna la normativa de aplicación. Se trata de poner en conocimiento los avances y la situación, no solo a aquellos actores directamente afectados o interesados (la comunidad científica y experimentadora), sino a la ciudadanía en general.

Una de las preocupaciones más extendida es la que plantea si realmente está justificado el daño que se infringe a los animales en relación con los beneficios (potenciales y reales) que conlleva el desarrollo de los proyectos de investigación. Con el objeto de dar a conocer a todas aquellas personas interesadas cuales son las actividades en las que se utilizan animales, las razones por las que se llevan a cabo tales actividades en el ámbito científico, así como qué medidas se han tomado para minimizar los posibles daños a los animales, se establece la obligación a las autoridades competentes de publicar un resumen, de fácil comprensión por el ciudadano de a pie, en el que se de información básica sobre en qué consisten los proyectos autorizados y en qué han consistido las medidas de adoptadas en el marco de las tres erres.

Asimismo se ofrece información, con carácter anual, de los animales utilizados con fines científicos, diferenciando especies animales, origen de los mismos y campos científicos en los que han sido utilizados. A partir del año que viene el formato de esta información se verá profundamente modificado, ya que el sistema de recogida de la información y el enfoque con el que se publicará en 2015 será totalmente novedoso, incluyendo información no ya sobre número de animales utilizados (como se ha venido haciendo tradicionalmente), sino sobre el número de usos que se hace de los animales, diferenciando entre otros aspectos la “severidad” de los procedimientos a que hayan sido sometidos.

Desarrollo y validación

El último pilar es el que pretende aumentar las posibilidades de utilizar las estrategias alternativas, mediante su desarrollo y validación por las instituciones y organismos que sirven de referencia a las autoridades competentes. Aquí el papel del Centro Común de Investigación (JRC o Joint Research Center) y de su Centro Europeo de validación de Métodos Alternativos (EURL-ECVAM por sus siglas en inglés) en particular, es primordial. Dada la amplitud de la tarea prevista y la necesidad de que todos los actores intervengan se han contemplado diferentes niveles de cooperación y participación en el proceso (PARERE-autoridades competentes, ESTAF-actores implicados, ESAC-científicos).

Conclusiones

Como conclusión queremos insistir sobre dos aspectos que consideramos relevantes. En primer lugar es necesario aclarar que los métodos alternativos no son solo aquellos en los que se alcanza el Reemplazo total de los animales, sino que también comprenden aquellos otros métodos y estrategias en las que se reduce el número de animales utilizados (Reducción) o se refinan las condiciones en los que éstos se utilizan y mantienen (Refinamiento). En todos estos

casos de aplicación de las 3 erres se obtienen métodos que suponen una alternativa a los métodos tradicionalmente utilizados.

En segundo lugar quisiéramos animar a la comunidad científica a dar los pasos que sean necesarios para poder implementar también en el ámbito de las 3 erres el cambio de paradigma que los avances y el desarrollo que en el campo de la biología molecular y de sistemas están haciendo posible en toxicología. En el futuro es posible que algunas pruebas puedan consistir ya no tanto en analizar los efectos que determinadas sustancias tóxicas tienen sobre los animales, sino más bien en evaluar los cambios metabólicos que a nivel molecular son los que realmente causan los mencionados efectos sobre los animales (y lógicamente el ser humano).

2. Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
3. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
4. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Bibliografía

1. Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986, relativa a las aproximaciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE).

Estrategias de identificación de planteamientos alternativos a la experimentación animal

Repetto G¹, Álvarez Herrera C¹, del Peso A²

¹Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla. Coordinador Sección de Métodos Alternativos de AETOX; Presidente de REMA. ²Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla.

Recibido 7 octubre 2014 / Aceptado 6 noviembre 2014

Resumen: Los investigadores deben asegurarse de que la información que podrían obtener con su experimentación no está ya disponible, que no existe otro procedimiento para llevarlo a cabo sin emplear animales y que el protocolo se ha diseñado teniendo en cuenta consideraciones de protección animal. Sin embargo, la identificación de procedimientos alternativos empleados por otros científicos sigue siendo un proceso muy complejo, debido, sobre todo, a la deficiente indexación de las publicaciones en las bases de datos bibliográficas. Una búsqueda eficiente debe basarse en emplear siempre varias bases de datos, en revisar al menos los documentos de los últimos 5-10 años. En primer lugar debe evitarse la duplicación inútil de investigaciones, es decir, asegurarse de que la información que pudiera obtenerse en el estudio no está ya disponible. A continuación se realiza la búsqueda de posibles alternativas de reemplazo. Si ésta no fuera productiva, se identificarían alternativas de reducción y refinamiento, tratando de mejorar, en lo posible, cada una de las fases de la experimentación animal. Los estudios toxicológicos de finalidad reguladora presentan la exigencia de utilizar protocolos oficiales, por lo que deben localizarse en sus directorios específicos. Las alternativas en la enseñanza y entrenamiento, como los modelos mecánicos, audiovisuales y de simulación, se encuentran recogidas en bases de datos específicas. Finalmente, cuando no se encuentran opciones válidas en otras fuentes, es posible recurrir a expertos, tanto directamente como en foros especializados. Todo ello se facilita con el buscador Buscaalternativas.com (<http://buscaalternativas.com>).

Palabras clave: Alternativas, experimentación animal, reducción, refinamiento, reemplazo

Abstract: Strategies for the identification of alternative approaches to animal experimentation. The researchers should be sure that the information obtainable with the experiments is not yet available, that there is no other possible procedure without the use of animals or that the protocol was designed taking into account animal protection considerations. However, the identification of alternative procedures employed by other scientists is a very complex process, mainly due to the deficient indexation of the articles. An efficient search must be based on the use of several data bases and the review of documents of the last 5-10 years. The search strategy presents several phases. Firstable, the unnecessary duplication of studies should be avoided, assuring the information obtainable in the study is not yet available. A search for replacement alternatives is then carried out. If it is not productive, reduction and refinement alternatives are identified to improve every phase of animal research. Toxicological regulatory studies must use official protocols, which should be localized in specific directories. Alternatives in education and

training, including mechanical models, audiovisuals and simulations are included in specific databases. Finally, when no valid options are found in other sources, it is possible to ask experts, directly or through specialized debate lists. The procedure is facilitated thanks to the Web Buscaalternativas.com (<http://buscaalternativas.com>).

Key words: Alternatives, animal experimentation, reduction, refinement, replacement

Introducción

La investigación se encuentra hoy día encauzada no sólo por razones éticas, logísticas, económicas y científicas, sino también por requerimientos legales. En el ámbito europeo debe destacarse la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos [1], que se traslada a la legislación española por el Real Decreto 53/2013 [1-2]. Esto implica que los investigadores han de mostrar la necesidad real de utilizar animales en las aplicaciones científicas y de enseñanza. Estas normativas pretenden asegurar la protección animal y, en particular, que se dispensen los cuidados adecuados a los animales utilizados; que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o lesión prolongados; que se evite toda duplicación inútil de procedimientos y que se reduzca al mínimo el número de animales utilizados en los procedimientos, aplicando en lo posible métodos alternativos.

De acuerdo con las citadas normativas, que adoptaron el "Principio de las tres erres" enunciado por Russell y Burch [3], el investigador debiera justificar, entre otros: la aplicación de métodos para reemplazar, reducir y refinar el uso de animales; el uso de anestésicos, analgésicos y otros medios para aliviar el dolor; las medidas para reducir, evitar y aliviar cualquier forma de sufrimiento de los animales a lo largo de toda su vida; el uso de puntos finales humanitarios; la estrategia experimental o de observación y modelo estadístico para reducir al mínimo el número de animales utilizados, el dolor, sufrimiento, angustia y el impacto ambiental, cuando proceda; la reutilización de animales y su efecto acumulativo sobre el animal; la propuesta de clasificación de los procedimientos en función de su severidad; las medidas para evitar la repetición injustificada de procedimientos; las condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales; los métodos de eutanasia; y la capacitación de las personas que participan en el proyecto [1,2].

Sin duda alguna la promoción de los *planteamientos alternativos* es uno de los aspectos básicos que impregnan la nueva normativa de protección animal. Esta es la terminología empleada en la Directiva 2010/63/UE, en concreto "alternative approaches" en inglés, y consecuentemente en el Real Decreto 53/2013 [1,2]. La

* e-mail: grepkuh@upo.es

denominación de planteamientos alternativos es muy acertada, ya que transmite que es necesaria una actitud abierta a nuevas opciones, más que la simple sustitución de unos procedimientos por otros. Además debe tenerse en cuenta que se ha ampliado el ámbito de aplicación para proteger también, por ejemplo, a los animales de los que se extraen tejidos para utilizarse en estudios *in vitro*. En la práctica [4], las opciones alternativas disponibles son fundamentalmente las incluidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales planteamientos alternativos

1. Evitar experimentos innecesarios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ; Protocolos normalizados. Disponibilidad de estudios previos, intercambio de información. Flexibilidad. Estrategias inteligentes. Modelos en la enseñanza.
2. Modelos Computarizados (<i>in silico</i>) de Predicción e integración de datos
3. Organismos inferiores: Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, invertebrados
4. Embriones en las etapas iniciales: peces, anfibios, reptiles, pájaros, mamíferos
5. Métodos <i>In vitro</i> : Organos, Cultivos, Sistemas acelulares
6. Estudios animales: Reducción: número de animales usados. Refinamiento: minimización del dolor y distress; nuevos modelos
7. Estudios en humanos

Son *planteamientos alternativos* aquellas técnicas que puedan aportar un nivel de información igual o superior al obtenido en procedimientos con animales, pero que no utilicen o utilicen menos animales o impliquen procedimientos menos dolorosos [2]. Por lo tanto, como métodos alternativos se incluyen a aquellas técnicas o estrategias experimentales que pretenden 1º el *Reemplazo* del empleo de animales; 2º la *Reducción*, es decir, la aplicación de estrategias encaminadas a utilizar el mínimo número de animales necesario para alcanzar el objetivo propuesto; 3º el *Refinamiento*, que incluye la mejora de aquellos procedimientos que afectan a la vida del animal de experimentación y permiten aliviar o reducir el posible dolor o malestar.

El objetivo del presente trabajo es facilitar los estudios experimentales teniendo en cuenta la adecuada aplicación de los planteamientos alternativos, para lo cual se desarrolló e incluyó en 2005 en Internet Buscaalternativas.com, un sitio en español sobre alternativas en / y a la experimentación animal (<http://buscaalternativas.com>), del que se ofrece una imagen en la figura 1.



Figura 1. Imagen del buscador de alternativas disponible en Internet Buscaalternativas.com (<http://buscaalternativas.com>)

La estrategia experimental

En cualquier proyecto experimental debiera realizarse una *planificación estratégica inicial* definiendo claramente los objetivos, elaborando las hipótesis a demostrar y especificando los análisis diana, incluyendo la determinación del conjunto de datos e

información que serán necesarios [5-7]. En todo este proceso existen una serie de herramientas que pueden ser útiles y que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales herramientas de ayuda sobre planteamientos alternativos

- Diagrama de Planificación Estratégica para Reducir el Uso de Animales en Ciencia Biomédica. FRAME. http://www.remanet.net/FAQ/documentos/strategic_planning_posterspanish.pdf
- Buscaalternativas.com encuentra alternativas de reducción, refinamiento y reemplazo <http://buscaalternativas.com/>
- Guía ECVAM de buena práctica de búsqueda de alternativas a los animales <http://bookshop.europa.eu/en/the-eurl-ecvam-search-guide-pbl.BN124391/>
- Curso de Diseño experimental de MFW Festing. <http://www.3rs-reduction.co.uk/>
- 3Erres - Foro de Alternativas a la Experimentación animal <http://www.rediris.es/list/info/3erres.es.html>
- SECAL-L: Foro de la Sociedad Española para las Ciencias del animal de Laboratorio <http://www.secal.es/>
- Toxicol- Foro de Toxicología <http://www.rediris.es/list/info/toxicol.html>
- COMPAMED Comparative Medicine Discussion List: mensaje a listserv@listserv.aalas.org y en el cuerpo: subscribe COMPAMED Nombre Apellido
- IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) Forum <http://www.iacuc.org>
- REMA- Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos <http://www.remanet.net/>

Se continúa con la *revisión de antecedentes*, evaluando críticamente la bibliografía para establecer el marco conceptual de referencia [8-13]. Se pretende conocer el estado de conocimiento hasta en ese momento, lo que se denomina como “el estado del arte”, que incluye lo que ya se ha investigado y sus resultados, cuando se hizo, cuales son los equipos que han destacado en ese tema, sintetizar la información, buscar indicaciones para nuevas hipótesis, buscar fundamento para ellas y conocer la metodología empleada y las razones de ello. Finalmente se extraen argumentos que apoyen la necesidad del estudio, y estimen la probabilidad de éxito y su relevancia.

Con esta información se procede a la definición del problema, centrando el campo de interés, la elaboración de la hipótesis que conteste a las preguntas realizadas y la redacción del proyecto y del plan de trabajo.

La *planificación del programa* implica además clasificar los métodos viables según el impacto en los animales, desde la no utilización de animales hasta el uso de animales con sufrimiento severo. Planear una secuencia de experimentos que ofrezca resultados satisfactorios con el menor uso animal y con la menor severidad. La figura 2 refleja la forma en que pueden organizarse las distintas etapas para alcanzar la meta con mayores posibilidades de éxito [5].

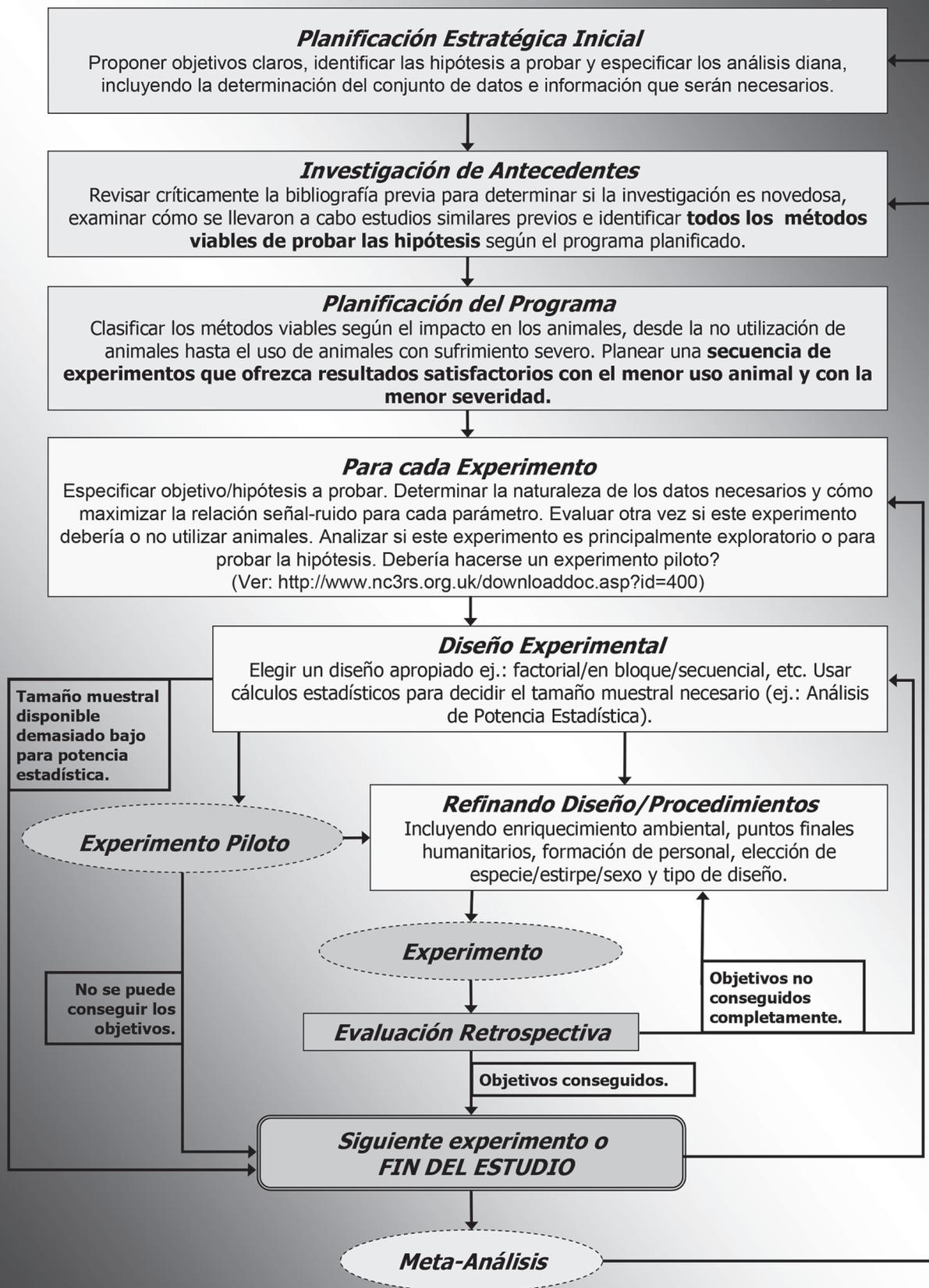
Para cada experimento se debiera especificar el objetivo/hipótesis a probar. Determinar la naturaleza de los datos necesarios y cómo maximizar la relación señal-ruido para cada parámetro. Evaluar otra vez si este experimento debería o no utilizar animales. Analizar si el experimento pretende probar la hipótesis o si es un experimento piloto de finalidad exploratoria, que son muy recomendables al iniciar líneas de trabajo.

A continuación debiera realizarse el diseño experimental, eligiendo un tipo apropiado ej.: factorial/en bloque/secuencial, etc. Usar cálculos estadísticos para decidir el tamaño muestral adecuado (ej.: Análisis de la potencia estadística). Todo ello facilita el refinado del diseño, en el que se incluyen aspectos de enriquecimiento ambiental, puntos finales humanitarios, formación de personal, elección de especie/estirpe/sexo y tipo de diseño.

Evitar la duplicación innecesaria de investigaciones

Aunque parezca obvio, debe recordarse que en primer lugar el investigador debe asegurarse de que la información que pudiera obtener en el estudio no ha sido ya conseguida, lo que haría innecesario realizar el experimento. Para ello deben consultarse varias *bases de datos bibliográficas generales* (PubMed, Agrícola,

Planificación Estratégica de Programas de Investigación



Para solicitud de copias email: michelle@frame.org.uk

Referencia : Gaines Das, Fry, Preziosi and Hudson, *ATLA* 37, 27-32, 2009

Figura 2. Planificación estratégica de programas de investigación [5]

etc) y bases de datos específicas de la especialidad considerada. Además de Pubmed debieran usarse, siempre que sea posible, Embase y Biosis. Se ha de insistir en la necesidad de usar varias bases de datos ya que la coincidencia de documentos recuperados en la misma búsqueda en las tres principales bases de datos biomédicas (PubMed, Embase y Biosis) es menor al 30% [10]. Ello implica que, si se desea conseguir una revisión exhaustiva, no es en absoluto suficiente realizar búsquedas de información en una sola de ellas.

Si se encuentran estudios que utilicen metodologías similares a las que se pretende emplear, es conveniente anotar las palabras clave que los describen por si fueran útiles posteriormente.

PubMed es un servicio gratuito de la Biblioteca Nacional de Medicina Norteamericana que incluye más de 24 millones de citas de artículos biomédicos (Medicina, Enfermería, Odontología, Veterinaria y otras ciencias preclínicas) publicados desde 1950 y extraídas de MEDLINE (4800 revistas biomédicas), OLDMEDLINE (2 millones de citas de artículos sin resúmenes) y de otras diversas revistas científicas. Enlaza con textos completos, una parte de ellos gratuitos a través de PubMed Central.

Agricola es la base de datos bibliográfica gratuita AGRICultural OnLine Access. Fue creada por la Biblioteca Nacional de Agricultura Norteamericana e incluye citas de literatura sobre agricultura, veterinaria, entomología, plantas, acuicultura, pesca, ganadería, alimentos, nutrición y ciencias medioambientales. Enlaza con fuentes de textos completos. Contiene referencias de libros publicados desde 1970 y artículos de revistas desde 1982. Es mucho más amplia que Medline, al incluir otras bases de datos en la ciencia del animal de laboratorio, manejo y alojamiento.

Embase ofrece cobertura de la literatura biomédica, con más de 28 millones de registros de más de 8400 revistas publicadas actualmente. Embase incluye más de 6 millones de discos y más de 2700 revistas que no están cubiertos por Medline.

Biosis, accesible desde la Web of Knowledge, es una fuente para investigaciones sobre ciencias biológicas y biomedicina, basada en revistas, reuniones, libros y patentes. Contiene más de 21 millones de registros desde 1926 de más de 5200 revistas. A través de Zoological Record proporciona información en biología animal y su taxonomía.

Limitaciones en la búsqueda de alternativas

Por muy diversas razones, la identificación de procedimientos alternativos empleados por otros científicos sigue siendo un proceso muy complejo. En primer lugar, la *indexación* actual de las publicaciones en las bases de datos bibliográficas no facilita la identificación de alternativas [13]. Por ejemplo, los términos clave que deberían ser básicos para este cometido, como “uso de alternativas a los animales, reducción, refinamiento...” no sólo se emplean con diversos significados en las diferentes bases de datos, sino que sólo se están asignando a una pequeña proporción de los artículos a los que les correspondería. Por ello, son poco útiles para recuperar la información, lo que obliga a utilizar en las búsquedas descriptores mucho más concretos. La elección de los términos adecuados requiere práctica y la realización de pruebas. Es muy útil comenzar con palabras clave de algún documento de tema semejante al objetivo.

En segundo lugar, la información contenida en las *bases de datos* está limitada, además, por los sesgos de publicación, idioma, de cobertura, del patrocinador o de disponibilidad de acceso. Por ello es imprescindible buscar la información en varias bases de datos, ya que ésta se encuentra muy repartida. Debieran utilizarse tres tipos de

bases de datos: *bibliográficas* (Ej. PubMed, Agrícola, Embase, Biosis), *factuales* o de datos depurados (AnimAlt-Zebet, dbAlm) y de *información diversa y páginas web especializadas*: (AltWeb, Buscaalternativas.com). Además pueden ser muy útiles los sistemas de búsqueda simultánea en varias bases de datos a través de metabuscadores específicos y seguir las sugerencias de la Tabla 3 para la selección de las bases de datos.

Tabla 3. Criterios para la selección de las bases de datos sobre alternativas

-
- Tipos de bases de datos:
 - Bibliográficas (PubMed, Agrícola, Embase, Biosis)
 - Factuales o de datos depurados (AnimAlt-Zebet, dbAlm)
 - De información diversa y páginas web especializadas: (AltWeb, Buscaalternativas.com)
 - Criterios básicos de selección:
 - Veracidad, es decir, fidelidad a los documentos originales
 - Objetividad en el tratamiento de los datos, separando la información de cualquier tipo de anuncios, y si es posible, citando la fuente original
 - Relevancia, o interés real de la información que contengan
 - Cobertura temática amplia y cantidad de información
 - Actualización periódica
 - Facilidad de manejo
 - Autoría y responsables bien definidos: personal o corporativa
 - Finalidad: educacional, promocional, comercial, etc.
 - Audiencia potencial
 - Alcance geográfico amplio
-

Los *portales o buscadores generales o de amplio espectro* pueden ser apropiados para encontrar algunos documentos específicos, pero no son útiles para búsquedas generales (Ej. Alternativas). Aunque no garantizan el éxito de la búsqueda ni la objetividad de la información, resultan interesantes por su gran capacidad de rastreo de archivos y páginas por gran parte de la red. Sin embargo están muy limitados ya que *no revisan bases de datos específicas*, dado que no tienen acceso a su información. Por lo tanto se encontrarán documentos concretos, pero no información depurada.

Quien realiza la búsqueda también aporta sus *propios sesgos*, entre los que se encuentran el sesgo de soberbia, el cultural o de tradición, el sesgo de la experiencia personal; el sesgo de la amistad; el sesgo de la fama de la institución/autor/revista; o el sesgo geográfico, que favorece a países importantes y a nuestros vecinos.

Para mejorar la efectividad, es necesario familiarizarse con la base de datos, ya que cada una está estructurada de forma diferente. Lógicamente es preciso emplear el idioma de la base de datos. En el caso del inglés, puede ser conveniente usar determinadas palabras en sus modismos británicos y americanos (Ej. anaesthesia, anesthesia).

Además, para que las búsquedas sean productivas es necesario realizarlas *sistemáticamente*. Ello implica que se ejecuten siguiendo un método explícito y reproducible, que reduzca al mínimo los sesgos y que seleccione la información más relevante. En primer lugar es preciso definir claramente qué información se desea encontrar. A continuación se recomienda preparar una lista con los descriptores, sinónimos o frases que mejor definan el *objetivo del estudio o área de estudio*. Puede usarse como base un protocolo o publicación similar a la prevista. A continuación se añaden o reducen los términos para obtener un número adecuado, es decir, suficiente pero no demasiado alto de resultados que permita manejarlos. Para ello, los términos suelen combinarse entre sí para reducir el número de respuestas, en las ventanas de búsqueda o con comandos de inclusión de ambos (y / and / +), inclusión de alguno (o / or), exclusión (no / not / -), frase exacta (“...”), etc.

Estrategias de búsqueda de alternativas

Es muy conveniente realizar una planificación previa, y seguir una secuencia de pasos protocolizados, que incluyen el registro de la metodología empleada que permita a cualquier persona repetir posteriormente la búsqueda y acceder a las mismas referencias o artículos. Para cada base de datos se sigue un proceso como el recomendado en la Tabla 4.

Tabla 4. Etapas en la búsqueda de información

1. Formulación de la pregunta en forma clara, precisa y concisa.
2. Preparación del perfil de búsqueda, es decir, de la forma de plantear la pregunta combinando varios términos. Esta fase es la más importante
3. Selección de la base de datos
4. Realización de la búsqueda
5. Evaluación inicial de los resultados en forma cuidadosa. Un número entre 10 y 60 registros puede ser útil en la mayoría de los casos, aunque podrán ampliarse o restringirse los resultados según el tipo de estudio.
6. Modificación del perfil de búsqueda para ampliar o restringir el número de resultados. Una posible estrategia, a menos de que se esté realizando una revisión exhaustiva, es tratar de obtener menos de 300 registros. A partir de la lectura de los títulos se realiza una segunda selección de unos 50 de ellos de los cuales se leerán sus resúmenes, y una tercera de unos 15 trabajos que se estudiarán completos.
7. Archivo de los resultados satisfactorios y la estrategia de búsqueda.
8. Repetición de la búsqueda en al menos dos bases de datos

Las estrategias de búsqueda de alternativas, incluyendo las bases y fases recomendadas se incluyen en la Tabla 5. Es necesario utilizar varias bases de datos, recuperar documentos de los últimos 5-10 años y anotar todos los datos que permitan reproducir la búsqueda posteriormente.

Tabla 5. Bases y fases de la búsqueda de alternativas

Bases	
•	Deben emplearse siempre varias bases de datos
•	Deben revisarse al menos los documentos de los últimos 5-10 años.
•	Deben anotarse las bases de datos utilizadas, el intervalo de tiempo que cubren, los descriptores de la búsqueda, la fecha y el resultado obtenido
Fases	
1	Evitar la duplicación inútil de investigaciones
2	Búsqueda de alternativas de Reemplazo
3	Búsqueda de alternativas de Reducción y Refinamiento
4	Alternativas en estudios toxicológicos o de finalidad reguladora
5	Alternativas en la enseñanza y entrenamiento
6	Otras opciones
8	La ayuda de expertos

A menos de que se trate de búsquedas de alternativas en la enseñanza o en estudios reguladores, para los que se recomienda acceder directamente a bases de datos específicas, en el resto de los casos debe procederse ordenadamente. En primer lugar debe evitarse la duplicación de investigaciones, para pasar a intentar encontrar alternativas de reemplazo. Si ello no fuera posible, se localizarían alternativas de reducción y refinamiento. Además de otras posibles opciones, como último recurso puede acudir al asesoramiento de expertos.

Búsqueda de alternativas de Reemplazo

Se recomienda iniciar la búsqueda en bases de datos generales como las ya indicadas, fundamentalmente *PubMed*. Además, expertos del Programa de Información sobre Toxicología y Salud Ambiental han desarrollado para la Biblioteca Nacional de Medicina Norteamericana el sistema *Altbib*, de Bibliografía sobre Alternativas al Empleo de Vertebrados vivos en Investigación Biomédica y Bioensayo. Sin embargo, lo más interesante de éste son las búsquedas predefinidas y actualizables (Live PubMed Searches) de procedimientos para diversos tipos de ensayos toxicológicos (<http://toxnet.nlm.nih.gov/altbib.html>).

Se inicia la búsqueda incluyendo términos que definan el *objetivo*

básico del estudio, no la metodología que se pretende usar (Ej. efectos *E. coli* hígado). Esto es muy importante, ya que hasta que se disponga de sistemas informáticos realmente expertos que sean capaces de localizar alternativas, debe evitarse en lo posible cercenar el ámbito de búsqueda. No debiera, por tanto, incluirse ni la especie, ni el tipo de agente o patología.

Una vez que se obtengan resultados, se intenta restringir la búsqueda a posibles modelos alternativos. Lamentablemente los descriptores que parecerían lógicos como “*alternatives*” no son demasiado útiles, pero conviene probarlos. En algunas bases de datos pueden ser útiles “*alternative, animal testing alternatives, animal use alternatives, replace*”. Finalmente, aunque no sea realmente exhaustivo, el descriptor más útil en estos momentos es “*vitro*”.

Por ejemplo, debe intentarse sobre todo localizar posibilidades de sustitución o reemplazo añadiendo (AND) algun/os términos relacionados con la sustitución, usando entre ellos OR. Ej. coli AND liver AND (vitro OR cell line OR hepatocyte)

Si no se encuentra ninguna alternativa válida de sustitución, debiera revisarse cuales son los modelos animales ya utilizados por otros investigadores con similar finalidad y pasar al punto siguiente.

Búsqueda de alternativas de reducción y refinamiento

Si no se identifica ninguna opción de sustitución, será preciso centrarse en el empleo adecuado de animales. Debiera actualizarse el protocolo experimental teniendo en cuenta los últimos avances científico-técnicos en diseño experimental, para evitar estrés y dolor y reducir en lo posible el número de animales empleados.

Entre los descriptores que pudieran emplearse junto al término animal se encuentran muy diversos de refinamiento (*refinement, acclimation, quarantine, blood collection, cage, caging, housing, husbandry, injection, welfare, enrichment, behavioural, euthanasia, handling, distress, (non-)invasive, pain, stress, anaesthesia, analgesia...*) y de reducción (*reduction, experimental design, statistical analysis, model...*).

La localización en bases de datos generales de algunas publicaciones recientes con un protocolo similar puede ser muy útil y cómoda. La ayuda de un experto en protección y experimentación animal es muy recomendable.

Sin embargo, ello debiera complementarse con la revisión de cada una de las etapas del procedimiento teniendo en cuenta los objetivos precisos del mismo, sobre todo inspeccionando bases de datos y documentos específicos de reducción y refinamiento que ayuden en sus diferentes fases, desde las condiciones generales, la elección del sustrato biológico o la especie animal, el número y la distribución por grupo de los individuos, la selección de las dosis y grupos, la elección de la vía y el periodo de tratamiento, los marcadores y la toma de muestras, la terminación y eutanasia, el análisis de los resultados y el diseño del modelo predictivo. Como punto de partida se recomienda utilizar Buscaalternativas.com

Alternativas en estudios toxicológicos o de finalidad reguladora

Por las peculiaridades propias de las investigaciones toxicológicas, de seguridad química o de estudios con finalidad reguladora, es conveniente revisar en primer lugar las bases de datos específicas. Si se trata de un estudio regulado, será obligatorio seguir un procedimiento estandarizado, validado y aceptado por las autoridades reguladoras correspondientes para la evaluación de sustancias, medicamentos, plaguicidas, residuos, efluentes, etc. En la actualidad muchos de estos protocolos están siendo revisados para

adaptarlos a los criterios de las tres erres.

Pero, aunque se trate de una investigación básica no regulada por ninguna norma específica, es muy conveniente comprobar si existe alguna directriz regulada que pueda ser útil o adaptable para el objetivo propuesto. Si no está disponible un protocolo específico para la finalidad requerida, debe comenzarse desde el principio revisando las bases de datos generales, como PubMed y su sistema AltBib.

La *Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico* (OCDE) ha ido elaborando los métodos de ensayo estandarizados y legalmente válidos en la mayoría de los países para determinar las propiedades intrínsecas de las sustancias químicas. Su compleja página Web es reestructurada frecuentemente con lo que los enlaces directos se modifican. Dispone de protocolos de cinco tipos: determinación de propiedades fisicoquímicas, efectos en sistemas bióticos, degradación y acumulación, efectos sobre la salud (humana) y actividades especiales. Afortunadamente están ya disponibles en forma gratuita.

Los protocolos de ensayo de la *Unión Europea* coinciden aproximadamente en un 80 % con los de la OCDE, y pueden obtenerse gratuitamente ya que forman parte de la normativa REACH [14], al igual que los protocolos de ensayo de la *Agencia Medioambiental Norteamericana*.

El Laboratorio Europeo de Referencia para Alternativas al Ensayo con Animales (EURL-ECVAM) incluye en su base de datos db-ALM información sobre los procedimientos en fase de validación y aceptación, así como a los protocolos de INVITTOX, una base de datos de FRAME/ERGATT/ECVAM de métodos experimentales *in vitro*. Su contrapartida norteamericana, el *Comité Coordinador Interagencias de la Validación de Métodos Alternativos* (ICCVAM) y el Centro del Programa Nacional de Toxicología para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos (NICEATM) también informan sobre los procedimientos cuya validación están promoviendo.

AnimAlt-ZEBET es una base de datos de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal en Biomedicina y campos relacionados del Instituto Alemán de Documentación e Información Médica. Ofrece más de 140 documentos con revisiones muy bien documentadas sobre alternativas y permite además, la búsqueda simultánea en varias bases de datos como XMEDALL, XPHARMALL, XTOLLITALL, XVET.

Alternativas en la enseñanza y entrenamiento

Existen muy diversas modalidades de alternativas utilizables en la docencia [7,15], como se recoge en la Tabla 6. Se recomienda iniciar la búsqueda de Alternativas en la enseñanza y entrenamiento en bases de datos específicas. Son webs muy completas que recogen numerosas posibilidades en diferentes disciplinas sin precisar del empleo de animales. Sobre todo incluyen modelos mecánicos, audiovisuales y de simulación.

Tabla 6. Principales modalidades de procedimientos alternativos en la enseñanza y formación

1. Modelos mecánicos.
2. Sistemas audiovisuales: Películas, vídeos, CD-ROM, DVD.
3. Simulaciones por ordenador y sistemas de realidad virtual.
4. Ensayos *in vitro*: Ej. cultivos celulares.
5. Estudios de observación y de campo.
6. Materiales de desecho procedentes de mataderos.
7. Prácticas clínicas: humanas y veterinarias.

Si no se localizara un sistema adecuado, se podrían revisar, además, las bases de datos bibliográficas. En los sistemas generales pueden emplearse los términos “*education, training, teach*, instruct*, mannequin, manikin, simulat*, video, virtual, cadaver, software, computer...*”). También existen sistemas dirigidos a mejorar la preparación de las personas que manejan animales de experimentación.

Otras opciones

Muy diversas instituciones proporcionan información sobre alternativas. *Altweb* - Alternativas al Ensayo Animal, en la Web, del Centro Johns Hopkins de Alternativas al Ensayo con Animales es un sitio que recoge gran variedad de información, sobre todo de noticias, aunque puede resultar difícil discernir cuales son los documentos realmente interesantes (<http://altweb.jhsph.edu/searchalt.htm>).

La página de *Ecopa*- Plataforma Europea de Consenso sobre Alternativas a la Experimentación Animal recoge muy variada información, sobre todo de los proyectos de investigación sobre alternativas financiados por la Unión Europea. Otras páginas, como la de la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal- *REMA*, incluyen información actualizada y noticias sobre validación y aceptación de nuevas alternativas (<http://www.remanet.net>). A través de *Buscaalternativas.com* se facilita el acceso a estas páginas y a otras muchas (<http://buscaalternativas.com>), ver figura 1.

La ayuda de expertos y foros

Si no se encuentra información suficiente sobre alternativas en las bases de datos disponibles, se puede solicitar la ayuda de expertos, bien directamente o en foros científicos de debate. Pueden localizarse equipos de investigación que emplean tecnologías alternativas en diversas bases de datos, como el Inventario de las Instituciones y Científicos Españoles Interesados en Métodos Alternativos al uso de Animales de Experimentación [16].

Los profesionales afines interaccionan entre sí y debaten en diversos foros y redes temáticas en Internet sobre alternativas y experimentación animal, como son *3Erres*- Foro de Alternativas a la Experimentación animal, *SECAL-L*: Foro de la Sociedad Española para las Ciencias del animal de Laboratorio, *Toxicol*- Foro de Toxicología, *Farmacol*- Foro de Farmacología, *COMP MED* – Lista de Discusión sobre Medicina Comparada o el Foro del Comité sobre el Uso y Cuidado Animal (IACUC), que son lugares muy adecuados donde plantear cuestiones sobre alternativas no resueltas por otras vías.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente gracias a una ayuda de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia y fondos FEDER, con cargo al proyecto CTM2012-31344

Bibliografía

1. UE (2010) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. DOCE L276 20/10/2010: 33-79. . (Consulta: 20/09/2014).
2. E (2013) Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los

- animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. BOE 34 8/2/2013: 11370-11421 (Consulta: 20/09/2014).
3. Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principles of Human Experimental Technique*. Methuen, Londres.
 4. Repetto G (1995) Recientes avances en la validación y aceptación de métodos alternativos *in vivo e in vitro*. *Rev Toxicol* 12:3-9.
 5. Das RG, Fry D, Preziosi R, Hudson M (2009) Diagrama de Planificación Estratégica para Reducir el Uso de Animales en Ciencia Biomédica *ATLA* 37, 27-32.
 6. Repetto M, Repetto G (2009) *Toxicología Fundamental*. 4ª ed. Editorial Díaz de Santos. Madrid.
 7. Castaño A, Repetto G (2009) *Métodos alternativos. Generalidades*. Capítulo 25 *En Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal*, Martín Zúñiga J, Nora S, Universidad de Alcalá.
 8. Langley G, Broadhead C, Bottrill K, Combes B, Ewbank R, Hawkins P, Hubrecht R, Jennings M, Newman C, Rowe S, Southey J, Todd M, Ward L (1999) *Accessing Information on the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experiments. Report and Recommendations of a Focus on Alternatives Workshop*. *ATLA* 27:239-245.
 9. Hakkinen PJ, Green DK (2002) Alternatives to animal testing: information resources via the Internet and World Wide Web. *Toxicology* 173:3-11.
 10. Bottrill K (2004) Search strategies on the internet: general and specific. *ATLA* 32S1: 585-589.
 11. Grune B, Dörendahl A, Köhler-Hahn D, Feuerstein C, Box R, Wohlgenuth H, Spielmann H (2004) New Sources for Alternative Methods on the Internet: The Objectives of Databases and Web Sites *ATLA* 32S1:573-582.
 12. Grune B, M Fallon, C Howard, V Hudson, J A. Kulpa-Eddy, J Larson, S Leary, A Roi, J van der Valk, M Wood, A Dörendahl, D Köhler-Hahn, R Box, H Spielmann (2004) Report and Recommendations of the International Workshop "Retrieval Approaches for Information on Alternative Methods to Animal Experiments" *ALTEX* 21:115.
 13. Roi AJ, Richmond J, Grune B (2013) *The EURL ECVAM search guide. Good search practice on animal alternatives*. 2nd Ed. European Commission, Joint Research Centre. Enlace: <http://bookshop.europa.eu/en/the-eurl-ecvam-search-guide-pbLBN124391/>. (Consulta: 20/09/2014).
 14. CE (2008) Reglamento (CE) n° 440/2008 de la Comisión, de 30 de mayo de 2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH).
 15. Vinardell MP (2014) Alternativas a los animales de laboratorio en docencia. *Rev Toxicol* 31:124-129.
 16. Repetto G, del Peso A, Salguero M, Repetto M (1999) Inventory of the Spanish Institutions and Scientists Involved in Alternatives to the use of Laboratory Animals (Refinement, Reduction or Replacement). *Rev Toxicol* 16:50-127. Disponible en: <http://aetox-pull.diffunditdisenoc.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2011/12/99-Inventario-Espa%C3%B1ol-sobre-alternativas-Repetto-1999.pdf> (Consulta: 20/09/2014).

Actividades de promoción y difusión de alternativas en España

de la Peña de Torres, E

Consejo Superior de Investigaciones Científicas. c/ Serrano 115 dpdo 28006 Madrid – España

Recibido 16 septiembre de 2014 / Aceptado 6 noviembre de 2014

Resumen: Se revisan las actividades de promoción y desarrollo de los métodos alternativos y complementarios a la experimentación animal en España. Se muestran las reuniones o jornadas que se han celebrado y organizado, incluyendo la constitución de la Red Española de Métodos Alternativos. Como foro de discusión para lograr un menor y más racional uso de los animales de experimentación, fomentando el desarrollo, validación y utilización de los métodos *in vitro*, tiene como fin conseguir el eficaz desarrollo de los procedimientos alternativos mediante el uso de los principios de reducción, refinamiento y reemplazo de los animales en la experimentación, lo que constituye la aplicación de las 3Rs. Se destaca el papel de la citada Red detallando información sobre la misma, sus miembros, la participación en numerosos cursos, seminarios y jornadas que se organizan por Universidades españolas y otras entidades, y la estrecha colaboración con el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y el Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, contando con observadores en su Junta Directiva.

Palabras Clave: alternativas, reducción, refinamiento, reemplazamiento

Abstract: Advocacy and outreach on alternatives in Spain. A revision of advocacy and development of alternative and complementary methods to animal testing in Spain was done. Meetings and conferences that have been organized, including the constitution of the Spanish Network for Alternative Methods, are shown. As a discussion forum for a lower and more rational use of experimental animals, promoting the development, validation and use of *in vitro* methods. The aims were the effective development of alternative procedures using the principles of reduction, refinement and replacement of animal use in experiments, which is the application of the 3Rs. The role of the aforementioned net is detailed, with the information about the network and their members. It has participated in many courses, seminars and conferences in the Spanish universities and other entities, maintaining a close collaboration with the Ministry of Health and the Ministry of Agriculture, Food and Environment, with observers included in the Board.

Key Word: alternatives, reduction, refinement, replacement

Las dos reuniones en Tres Cantos

El inicio de la aplicación del principio de las 3 erres comienza con la publicación *The principle of humane experimental technique* de Russell & Burch [1], principio que considera el reemplazo, la reducción y el refinamiento de los animales en experimentación. En

* e-mail: epena@ica.csic.es

España son muy variadas las actividades y reuniones que se han realizado y se mostraban en el trabajo del documento preparado para la constitución de una red sobre métodos alternativos [2], en dicha publicación quedaba claramente expuesta la existencia de diferentes acciones y actividades científicas para el desarrollo de procedimientos alternativos, junto a la existencia de publicaciones de gran trascendencia sobre el uso y aplicación de los métodos alternativos [3-5]

Las principales actividades sobre el desarrollo y difusión de los métodos alternativos comienzan de forma coordinada tras la celebración, en colaboración con el Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos de la Asociación Española de Toxicología GTEMA/AETOX, del que el Dr. Repetto era su coordinador, de la reunión conjunta titulada “Avances en la Aplicación de los Métodos Alternativos *In Vitro* en la Evaluación de Medicamentos, Cosméticos y Productos Químicos”, en el centro de Smithkline Beecham Pharmaceuticals de Tres Cantos (23 de mayo de 1997).

Se organizó otra reunión en colaboración con Glaxo Wellcome, que se tituló “Reunión sobre Desarrollo y la Coordinación con ECVAM de los Españoles Interesados en Métodos Alternativos” celebrada en Tres Cantos (21 de octubre de 1997), de la que se elaboró un Acta [6]. Después de la celebración de estas dos reuniones, se ha venido trabajando de forma coordinada en el desarrollo y difusión de los métodos alternativos, lo que se materializó mediante la constitución de la Red Española de Métodos Alternativos REMA.

El Grupo de Trabajo de ICLAS/CSIC

Otras razones externas contribuyeron al desarrollo de los métodos complementarios y alternativos en España. El Presidente saliente del International Council of Laboratory Animal Sciences ICLAS, Dr. Harry C. Rowsell (1921-2006), Director Ejecutivo del *Canadian Council on Animal Care* CCAC, remarcaba el interés en considerar los ensayos complementarios a la experimentación animal, dada la demanda que se estaba desarrollando socialmente en el interés en profundizar y desarrollar los métodos complementarios y alternativos, para un menor uso de animales en la experimentación científica; y ello influyó en que la Junta de Gobierno de ICLAS en Bangkok, Tailandia (1988), considerara que las alternativas debían formar parte de las actividades de interés en las ciencias sobre animales de laboratorio. Más tarde la Junta de Gobierno de ICLAS, celebrada en Hyderabad, India, (1994), a propuesta del nuevo Presidente, el Dr. Jean Maisin, acordó la creación de un grupo de trabajo sobre métodos complementarios de ICLAS que se denominó “ICLAS *Working on Complementary Methods*”, descrito en la Historia de ICLAS escrita por Eriksen y Hopla [7]. Todo ello se materializó con la organización del ICLAS/CSIC *Working Group on Complementary Methods/ICLAS/CSIC*, Grupo de Trabajo sobre

Métodos Alternativos, que celebramos en Talavera de la Reina del 27-30 de abril de 1995, de la que se editó un monográfico, de la Peña *et al.* [8]. El Grupo de Trabajo reunió, con el apoyo de ICLAS, el Ministerio de Educación y Ciencias, Junta de Castilla La Mancha y CSIC, durante tres días, a destacados representantes de organismos de gran relevancia e implicados en el desarrollo y difusión de los métodos alternativos, contando con la participación de las siguientes personalidades: 1. Dr. M. Balls Director de ECVAM/JRC (*Environmental Center of Validation Alternatives Methods*) de Ispra, Italia; 2. Dr. A. Golberg Director del CAAT (*The Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing*) de Baltimore, USA; 3. Dra. M.J. Gómez-Lechón de La Fe de Valencia, España; 4. Dr. H Köeter de la OECD Paris, Francia; y 5. Dr. H. Spellman Director del ZEBET (*Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz-und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*) de Alemania.

La Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal

En la Reunión para el Desarrollo y la Coordinación con ECVAM de los Grupos Españoles intersados en Métodos Alternativos, celebrada en el Centro Glaxo Welcome de Tres Cantos, Madrid, el 21 de octubre, 1997, fue donde quedó constituida la Comisión Promotora, formada por los siguientes Dres: Adela López de Cerain (Universidad de Navarra, Pamplona), José Vicente Castell (La Fe, Valencia), Eugenio Vilanova (Universidad Miguel Hernández, Elche), Guillermo Repetto (Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses, Sevilla), Domingo Gargallo (GlaxoWellcome, Madrid), Eduardo de la Peña (CSIC, Madrid); y con la esponsorización de *Glaxo Wellcome*, se pudieron celebrar siete reuniones de trabajo en el citado Centro, en abril, septiembre y octubre en 1998, y en junio y dos en noviembre en 1999.

La Comisión Promotora elaboró el Documento de Trabajo para la Creación de la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal (REMA) [2], en el que se presentaban las reuniones celebradas y otras iniciativas que con anterioridad se habían realizado en España; y también a partir de la última reunión de Comisión Promotora, se organizó la reunión preparatoria para la convocatoria de la Jornada Científica para la Constitución y Puesta en Marcha de Red Española de Métodos Alternativos que celebramos en el Ministerio de Sanidad (1 diciembre de 1999).

En la reunión celebrada en el Ministerio de Sanidad, todos los asistentes recibieron el número monográfico de la Revista de Toxicología, Repetto *et al.* [9], una lista de personas, centros y grupos que trabajan o están interesados en la utilización de los métodos alternativos, y como fruto de la reunión en el Ministerio, se formó y constituyó la Comisión Coordinadora de REMA.

La Comisión Coordinadora designada en la reunión estuvo constituida por D^a. Consol Fina de ANDA, Dra. Argelia Castaño del CISA-INIA, Dr. Domingo Gargallo de Glaxo Wellcome, Dra. M^a José Gómez-Lechón y Dra. José Vicente Castell del Hospital La Fe, Dra. Adela Lopez de Cerain de CIFA-Universidad de Navarra, Dr. Eduardo de la Peña del CSIC-CCMA, Dra. Pilar Prieto del ECVAM del JRC; Dr. Eugenio Vilanova de la Universidad Miguel Hernández, Elche, y Dr. Guillermo Repetto del Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses. Esta Comisión fue apoyada por 20 entidades del mundo científico, 4 entidades de defensa de los derechos de los animales y 5 entidades de la industria.

La Comisión Corrdinadora se constituyó formalmente el 2 de marzo de 2000; y preparó el documento sobre la constitución de la citada

Red Española de Metodos Alternativos a la Experimentación Animal (REMA) como un foro de discusión para lograr un menor y más racional uso de los animales de experimentación, fomentando el desarrollo, validación y utilización de los métodos *in vitro*, con el fin de conseguir una mejor y eficaz aplicación de los principios de reducción, refinamiento y reemplazo del uso de animales en la experimentación; estaba formada por los miembros que como ya hemos indicado, pertenecían a la academia (Universidad e Investigación), industria, administración y entidades protectoras, esta visión de conjunto y diversificada nos ha permitido organizar y fomentar reuniones interesadas en el desarrollo y promoción de los métodos alternativos; se definieron las bases y la estructura del funcionamiento de REMA [2]; y este proceso de constitución culminó con la inscripción legal de REMA, para lo que se obtuvo el número de registro de asociaciones y el NIF.

La Junta Directiva de REMA ha celebrado desde el año 2000, 34 reuniones de la JD y organizado 19 Reuniones y Jornadas y Cursos (Tabla 1), que han contado con un total de 151 ponentes, con aportaciones sobre diferentes aspectos teóricos y prácticos de los métodos alternativos, destacando en la misma el título de cada uno de ellas, fecha, lugar; y que, en la gran mayoría de las reuniones contamos con la Presidencia de Honor de SM la Reina de España.

REMA integra y coordina por tanto las iniciativas de la industria, la administración y la sociedad con las del mundo científico respecto al estudio, validación, aplicación e implementación legal del uso de métodos alternativos, así como impulsa la divulgación de la problemática y los avances alcanzados en este campo; sus miembros han participado en más de 50 cursos de protección y experimentación animal; su actividad ha permitido conseguir una mejor aplicación de los principios de reducción, refinamiento y reemplazo del uso de animales en la experimentación, promocionar el desarrollo, validación, aplicación e implementación legal de métodos alternativos, especialmente de los procedimientos *in vitro*, e impulsa la divulgación y difusión de los requerimientos normativos y los avances alcanzados.

Participa y colabora en la elaboración de las últimas Directivas, Reglamentos y disposiciones que la Administración ha promulgado recientemente; de la normativa de protección animal Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos; en la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos; y en el Real Decreto 53/2013 donde se establecen las normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos; mantiene actualmente un convenio de colaboración con el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, punto de contacto de PARERE Network (*Preliminary Assessment of Regulatory Relevance*) y en la actualidad asesora en todo lo relativo a los procedimientos alternativos y en lo aspectos relacionados con alternativas y la aplicación de las 3Rs, y asesora en la legislación y en las nuevas regulaciones.

Son varios los miembros de REMA que han publicado trabajos sobre métodos alternativos; remarcando tanto sobre el empleo de los procedimientos alternativos como el que existe una necesidad del uso de la experimentación animal, para la evaluación toxicológica de sustancias y mezclas, productos químicos, biocidas, productos farmacéuticos y productos fitosanitarios [10-13]

Tabla 1. Reuniones sobre Métodos Alternativos de 1995-2014

Reuniones sobre Métodos Alternativos de 1995-2014		
1	ICLAS/CSIC Working Group on Complementary Methods <i>Grupo de Trabajo de ICLAS/CSIC sobre Métodos Complementarios.</i>	Centro Regional de Salud Pública. Talavera de la Reina, 27-30 de abril, 1995
2	Avances en la Aplicación de los Métodos Alternativos <i>In Vitro</i> en la Evaluación de Medicamentos, Cosméticos y Productos Químicos.	Tres Cantos. Madrid, 23 de mayo, 1997
3	Reunión para el desarrollo y la coordinación con <i>ECVAM</i> de los grupos españoles interesados en métodos alternativos.	Centro Glasso Welcome. Tres Cantos, Madrid, 21 de octubre, 1997
4	Jornada Científica para la Constitución y Puesta en Marcha de REMA (Red Española de Métodos Alternativos).	Ministerio de Sanidad. Madrid, 1 de diciembre, 1999
5	I Jornada Nacional de la Red Española De Métodos Alternativos(*). Los Métodos Alternativos y la Estrategia Europea de Evaluación de Sustancias Químicas.	Madrid, 28-29 octubre, 2002
6	II Jornada Nacional de la Red Española de Métodos Alternativos: Genómica, proteómica y citómica: Nuevas herramientas en el desarrollo de medicamentos.	CSIC – CCMA. Madrid, 1 de marzo, 2004
7	Curso-Taller de Reducción, Refinamiento y Reemplazo de animales de experimentación de Reducción, Refinamiento y Reemplazo en Investigación, Desarrollo y Docencia. Facultad de Medicina.	Universidad Autónoma de Madrid, 23 noviembre, 2005
8	II Curso-Taller Reducción, Refinamiento y Reemplazo De Animales En Investigación, Desarrollo y Docencia.	Córdoba, 20 de noviembre, 2007
9	X Aniversario de la Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal. IV Jornada de REMA. <i>“Los métodos alternativos a la experimentación animal ante las nuevas normativas internacionales”</i>	Colegio Veterinarios de Madrid, 1 de diciembre, 2009
10	<i>Meeting 3Rs needed in The Pharmaceutical Research and Development</i>	Ministerio de Sanidad y Consumo, 19 de mayo, 2008
11	Workshop “Bottlenecks in the application of 3Rs in the R & D process in the pharmaceutical industry”.	Ministerio de Sanidad y Consumo, 20 de mayo, 2008
12	3er Curso REMA: Calidad y Métodos Alternativos a la Experimentación Animal. NOSCIRA.	CSIC Centro de Ciencias Medioambientales, 27 de mayo, 2009
13	Mesa Redonda sobre Métodos Alternativos en Experimentación Animal. XII International Congress of Toxicology IUTOX. IV REMA.	Barcelona-España, 16-20 de julio, 2010
14	Pre-Congress Course "Evaluation of Drugs Without Animals." REMA IUTOX-2010. XII International Congress of Toxicology.	Barcelona España, 16-20 de julio, 2010
15	V Jornada de REMA Modelos <i>in vivo</i> y Alternativas en Investigación Biomédica.	Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra, 4 de mayo, 2011
16	12 ECOPA Annual Workshop "The Future of 3Rs - From Innovation to Validation”.	Madrid – España, 11 noviembre, 2011
17	VI Jornada REMA Avances en la Implantación de Métodos Toxicológicos Alternativos. <i>In Memoriam</i> de Joan Albert Vericat.	CSCI - ICA 18 de enero, 2013
18	Mesa redonda de métodos alternativos: Aplicaciones de los sistemas alternativos. XX Congreso Español de Toxicología y IV Iberoamericano.	Universidad de Salamanca, 26-28 de julio, 2013
19	VII Jornada de REMA GSK.	Tres Cantos, 1 de abril, 2014.

La Plataforma Europea de Consenso sobre Alternativas - ECOPA se constituye a finales de 2002, como una asociación europea de la que forman parte integrante las Plataformas Nacionales que tienen una actividad reconocida y una estructura jurídica definida, a consecuencia de que en el World Congress on Alternatives (Bolonia 1999), se discutió la conveniencia de aglutinar las iniciativas y esfuerzos llevados a cabo en los distintos países europeos para fomentar el desarrollo y uso de los modelos alternativos a la experimentación animal. Esta iniciativa ponía en contacto a las

plataformas nacionales de países europeos que aceptaron el principio de que eran partes integrantes de la misma, la industria, el mundo científico y universitario, la administración y los movimientos sociales (protección animal y consumidores) (<http://ecopa.vub.ac.be>).

REMA se integró e impulsó a ECOPA, participando desde el principio en el lanzamiento de esta iniciativa, miembros de ella han formado parte de su junta directiva, ocupando su vicepresidencia el

Dr. José Vicente Castell, y la presidencia de la misma la Dra. Adela López de Cerain. Esta coordinación de los esfuerzos de las distintas Plataformas europeas se ha convertido en el interlocutor reconocido en el ámbito internacional sobre los procedimientos alternativos.

Participó mediante la Comisión Coordinadora de REMA, en sendos Proyectos demandados por la Unión Europea: 1) *Evaluation Socio-economic impact and the applicability of in vitro alternative methods of the 5 research contracts in the 5FP area 3.1.4. Specific Support Actions VI Programa Marco IP. IR: Comisión Cordinadora de de REMA (FP6-2004-Lifessxihealth-5) 2006-2008;* 2) *Consensus networkking on alternatives methods within Europe CONAM European Consensus Platform on 3R-alternatives (ECOPA) Specific Support Actions VI Programa Marco IR M. Vera Rogier / Bélgica, y Comisión Corrdinadora de REMA, 2003-2006.*

REMA cuenta con una página web donde se detalla toda la información, noticias, cursos y actividades de la misma. Sus miembros desde su constitución vienen participando en cuantos cursos, seminarios y jornadas se realizan por las Universidades españolas o en las organizadas por otras entidades; los programas y contenidos de cada una de las actividades organizadas pueden ser consultados en su página web; y dejan constancia de una clara predisposición a colaborar con toda iniciativa que promocióne o difunda el desarrollo del empleo y difusión de las 3Rs. (<http://www.remanet.net>)

Colabora desde su constitución con los diferentes sociedades científicas, que contemplan aspectos relacionados con el principio de las 3R: Reducción, Refinamiento y Reemplazo del uso de animales en la experimentación; de entre ellas deseo destaca a la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio, que ha organizado mesas redondas en sus congresos sobre métodos alternativos y ha editado en la revista Animales de Laboratorio, varios artículos de miembros de REMA [14-17]; y con la Asociación Española de Toxicología, que en 1992 creó el Grupo de Trabajo Espacializado en Métodos Alternativos (GTEMA), en la actualidad Sección de Métodos Alternativos, y en sus respectivos congresos que bianualmente ha celebrado, ha mantenido una sección sobre métodos

alternativos [18].

Difunde información sobre alternativas mediante su portal en internet con noticias actualizadas sobre alternativas (<http://www.remanet.net>), realiza quincenalmente la difusión de un Boletín de actividades sobre alternativas por correo electrónico a las personas interesadas, dispone de un activo foro de discusión y debate sobre alternativas denominado 3ERRES con más de 400 suscriptores de 14 países y colabora con los medios de comunicación social

Promociona las alternativas otorgando premios y becas de asistencia a congresos y reuniones sobre las mismas, ha organizado 5 jornadas generales de divulgación de alternativas y ha participado en más de 100 actividades científicas; ha organizado 7 cursos específicos sobre alternativas, 3 de ellos internacionales, y en cursos de protección y experimentación animal de diversas categorías explicando los conceptos básicos y las estrategias para identificar alternativas en las bases de datos y ha difundido procedimientos alternativos; y ha participado en cursos de formación del personal de todas las categorías en diferentes comunidades autónomas, en este sentido es de destacar la existencia del buscador específico de alternativas (<http://buscaalternativas.com>).

Mantiene una estrecha colaboración con el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y el Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, sus representantes forman parte de REMA como observadores junto al conjunto de los miembros que forman parte de la Junta Directiva de REMA.

En la Tabla 2, se muestran las personan han formado y que actualmente forman parte de la Junta Directiva de REMA. La Figura 1 muestra un corolario de sus actividades desde 1995 a 2014, destacando que en 2009 se celebró la Jornada conmemorativa del 10º aniversario de la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos, el 1 de diciembre en Madrid; y en el IUTOX-2010, *XII International Congress of Toxicology*, Barcelona, 2010, se organizó la sesión “*Global impact of the 3Rs strategy on the regulatory process: sharing experiences and future trends*” coordinada por el Dr. Eugenio Vilanova de AETOX y REMA, y presidente del citado

Tabla 2. Miembros de las Juntas Directivas de REMA (2000-2014)

Miembros de las Juntas Directivas de REMA (2000-2014)	
Ejecutiva	1. Presidente: Guillermo Repetto (U Pablo de Olavide, de Sevilla) 2. Vicepresidente: Domingo Gargallo (Grupo Ferrer, Barcelona) 3. Secretario: Alberto Díez Michelena(ANDA/Eurogroup for Animals, Madrid) 4. Tesorera: Mª José Gómez Lechón (Hospital La Fé, Valencia)
Vocales	5. Argelia Castaño (I.S. Carlos III, Madrid) - <i>Presidenta de Honor de REMA</i> 6. José Vicente Castell (Hospital La Fé, Valencia) 7. Francisco Ferrándiz (OTIME- Oficina Técnica Internacional del Medicamento) 8. Adela López de Cerain (Universidad de Navarra, Pamplona) 9. Eduardo de la Peña de Torres (CSIC, Madrid) – <i>Presidente de Honor de AETOX</i> 10. Pilar Prieto (Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos, Italia) 11. Eugenio Vilanova (Universidad Miguel Hernández, Elche) 12. Nicolas Fabre (Unilever, Holanda) 13. Joaquin de Lapuente (Parc Científic de Barcelona) 14. Jorge Estévez (Universidad Miguel Hemández, Elche)
Observadores	15. Elina Valcarce de Angulo. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 16. Pilar León. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 17. Ana Fresno. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 18. Mercedes Perote. Área de Protección Animal, DGMA. Comunidad de Madrid
Miembros anteriores	19. Consol Fina Montaner- <i>Miembro Honorífico</i> 20. Nuria Basi - <i>Miembro Honorífico</i> 21. Manuel Navarro 22. Miguel Galvá 23. Joan Albert Vericat (1951-2012)



Figura 1. Documentación gráfica de actividades de promoción y difusión de métodos alternativos en España

congreso IUTOX2010.

En conclusión la iniciativa de crear la Red Española de Métodos Alternativos y la constitución de la misma, por miembros procedentes de la Academia, Administración, Industria y Grupos sociales interesados en la protección animal y en los métodos alternativos, ha permitido difundir, promocionar y desarrollar la utilización y aplicación de las tres erres (3Rs), y que el modelo de constitución se haya aplicado para la formación de otras nuevas redes europeas de ECOPA.

Por todo lo citado, las actividades, iniciativas y fomento de las 3Rs, se han venido desarrollando en la promoción y difusión con un gran éxito, por la constante, continuada y activa labor que la Red Española de Métodos Alternativos desarrolla en España en colaboración con otras entidades y mantiene desde su constitución.

Agradecimientos

Agradezco y dedico este artículo a los miembros que han pertenecido a las Juntas de REMA, Da. Consol Fina, Dra. Nuria Basí, Dr. Manuel Navarro, y a la memoria de nuestro recordado compañero Dr. Joan Albert Vericat; y a cuantas personas trabajan en el desarrollo de las 3Rs, en la aplicación de los métodos alternativos y complementarios a la experimentación animal.

También deseo expresar mi sincero agradecimiento a la Asociación Española de Toxicología, que ya mostró su interés al crear el Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos (GTEMA) y por la iniciativa de editar el presente monográfico sobre métodos

alternativos en la Revista de Toxicología, y en especial al Dr. Guillermo Repetto coordinador de GTEMA y coordinador de este número.

Bibliografía

1. Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principle of Humane Experimental Technique* Universities Federation for Animal Welfare.
2. de la Peña E, Castell JV, Gargallo D, Lopez de Cerain A, Repetto G, Vilanova E (1998) Documento de Trabajo para la Creación de la Red Española para el Desarrollo de Métodos Alternativos (REMA) *Rev. Toxicol.*15: 133-142.
3. Castell JV, Gómez-Lechón MJ, eds. (1992) *In vitro Alternatives to Animal Pharmacotoxicology*. Ed. Farmaindustria, Madrid (1992) pp.108.
4. Repetto G, del Peso A, Repetto M (1995) Métodos Alternativos *in vitro*. Capítulo 2. En Repetto M (ed) *Toxicología Avanzada*. Diaz de Santos, Madrid, pp 37-59.
5. Castell JV, Gómez-Lechón MJ, eds. (1997) *In vitro in Pharmaceuticals Research*. Academic Press. London.
6. Gascó P, Barrueco C, Guadaño A (1997) Acta Reunión para el Desarrollo y la Coordinación con ECVAM de los Grupos Españoles Interesados en Métodos Alternativos (21 octubre 1997) *Glasso Wellcome*. Tres Cantos 1997. 16 pp..
7. Erichsen S, Hopla C (2004) *History of the International Council*

- for *Laboratory Animal Science*. ICLAS. Oslo, Norway and Oklahoma, USA. ICLAS Document (22-12-2004).
8. de la Peña E, Guadaño A, Barrueco C, Repetto G, González-Mencio F, García Partida P, (1995) *ICLAS Working Group on Complementary Methods*. Gráfica Gruma Madrid. 101 pp.
 9. Repetto G, del Peso A, Salguero M, Repetto M (1999) Inventario de las Instituciones y Científicos Españoles Interesados en Métodos Alternativos al Uso de Animales de Experimentación. *Rev. Toxicol* 16: 40-127.
 10. de la Peña E, Guadaño A (2000) Evolution and coordination of the alternative methods in Spain. *Science Total Environ* 247: 333-335.
 11. Castaño A, Repetto G (2009) Métodos Alternativos Generalidades. En: *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*. Martín J. Nora S. Universidad de Alcalá 2009.
 12. de la Peña E (2013) Necesidad de la Experimentación Animal *Rev Salud Pública* 13: 89-92.
 13. Repetto G et al. (2014) Evaluación Toxicológica y de riesgos específicos En M. Repetto (ed) *Postgrado de Toxicología*. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla. CD-ROM. 2014.
 14. Repetto G (2013) Planteamientos Alternativos a la Experimentación Animal. *Animales de Laboratorio* 58: 16-21.
 15. Azqueta A, López de Cerain A (2013) Versatilidad del Ensayo del Cometa para Evaluar Genotoxicidad *Animales de Laboratorio* 58: 24-2524.
 16. Sogorb MA, Estévez J, Lapuente J, Vilanova E (2013) Alternativas a la Experimentación Animal para la Evaluación de Toxicidad para el Desarrollo *Animales de Laboratorio* 58: 24-2524.
 17. Tolosa L, Donato MT, Castell JV, Gómez-Lechón MJ (2013) Tecnología High-Content Screening (HCS) para la Determinación del Potencial Hepatotóxico *Animales de Laboratorio* 58: 40-44.
 18. de la Peña E (2014) Historia de la Asociación Española de Toxicología *Rev Toxicol* 31: 1-9.

La reducción del número de animales de experimentación y el cálculo del tamaño muestral: una mesa con cinco patas.

Villamayor, F

Trial Form Support SA, Barcelona

Recibido 25 septiembre de 2014 / Aceptado 10 noviembre 2014

Resumen: El cálculo del tamaño muestral necesario para la consecución de los objetivos de un experimento está basado en cuatro factores interdependientes: tamaño de efecto, nivel de significación, potencia estadística, y variabilidad de la muestra. El trabajo de planificación previo a la ejecución del estudio es fundamental para obtener el máximo de información con el número mínimo de animales.

Palabras clave: Estadística, tamaño muestral, reducción.

Abstract: Reduction of the number of animals in experiments and sample size calculation: a five-legged table. Sample size calculation to accomplish with the objectives of an experiment is based in four interdependent factors: effect size, significance level, statistical power and sample variability. The planning of the study, prior to execution, is fundamental to obtain the maximum of information from the minimum number of animals.

Keywords: Statistics, sample size, reduction.

Introducción: planificación y tamaño muestral

La segunda ley de la Termodinámica establece que, un sistema aislado, sin un aporte externo de energía, tiende a la uniformidad. En cambio, mediante una aportación de energía externa, es posible crear orden y por tanto generar información [1]. Un experimento no deja de ser en cierto modo un sistema en el que siguen siendo válidas las leyes de la Termodinámica. Por tanto, si no se aporta energía, el resultado final va a ser el caos. La energía deberá aportarla el investigador responsable. Y una parte importante tendrá su fuente en el diseño o planificación del experimento. Es importante insistir en este hecho: Cuanto más esfuerzo se dedique al planificar, mayor será la cantidad de información que se obtenga, mejor será su calidad y, por tanto, los resultados serán más fiables. No es esto ninguna opinión, ni responde a un principio filosófico o una forma de pensar: Es consecuencia directa de una de las leyes de la Física.

El investigador va a planificar su experimento en base a una hipótesis de partida. Cree que ésta puede ser cierta, y dedica sus esfuerzos a reunir datos que la apoyen. Una vez analizados estos datos, decidirá si va a considerar cierta su hipótesis, o no. Pero, dado que se está operando con el método científico, existe una cierta incertidumbre en la decisión que se tome: según la decisión que tome, su resultado, puede ser erróneo.

Es lógico que se plantee si existe alguna manera de controlar esta incertidumbre. El problema es reunir la suficiente evidencia. La materia de que está formada la evidencia son los datos. Y la cantidad

de datos está directamente relacionada con el número de unidades experimentales que se utilicen. La unidad experimental es el sujeto experimental mínimo e independiente del resto sobre la que van a medirse los efectos en los que está interesada la investigación. El número de sujetos experimentales que se utilicen en un estudio es lo que se denomina su "tamaño muestral". Por tanto, cuanto mayor sea el tamaño muestral mayor va a ser la evidencia que permitirá verificar si la hipótesis que se quiere probar es cierta o no. Pero, por muchas razones, el tamaño muestral no puede ser tan grande como se desee. Hay que poner unos límites, principalmente éticos o presupuestarios. El tamaño muestral adecuado debe ser el mínimo que permita llegar a los objetivos del estudio. La utilización de un tamaño muestral adecuado va a permitir controlar la incertidumbre en la decisión de si la hipótesis de trabajo es cierta o no. En el resto de este artículo verá cómo puede lograrse esto y las implicaciones que conlleva.

Material y Métodos: Datos necesarios para el cálculo del tamaño muestral.

No existe un único método para el cálculo del tamaño muestral. Una ojeada a Internet nos revela que existe como mínimo una fórmula distinta para cada diseño experimental y para cada objetivo que pueda plantearse. Por ejemplo, en el Centre for Clinical Research and Biostatistics (CCRB) de la Chinese University of Hong Kong publican una útil página web (<http://www.cct.cuhk.edu.hk/stat/>) para el cálculo en línea del tamaño muestral para diversos diseños y objetivos experimentales. No cubre todos los casos, pero podemos usarlo para ilustrar lo que sigue, y su funcionamiento es simple (existen otros recursos, algunos gratuitos (ver Anexo), así como programas comerciales para el cálculo del tamaño muestral, que cubren los supuestos no contemplados por el recurso del CCRB). En primer lugar hay que escoger el tipo de experimento que se propone realizar: comparar medias, proporciones, supervivencias, etc. Y luego hay que escoger el diseño: Una sola muestra, dos muestras independientes, dos muestras dependientes, etc. Y finalmente hay que escoger la hipótesis de partida: Igualdad entre tratamientos, prueba de no-inferioridad, prueba de superioridad, prueba de equivalencia...

En este punto se abre un formulario en el que hay que introducir los datos o parámetros necesarios para el cálculo del tamaño muestral necesario para el experimento. Existe un formulario para cada uno de los posibles caminos en el árbol de decisión previo: Objetivo-Diseño-Hipótesis. No obstante, los conceptos comunes subyacentes son comunes.

Tomemos por ejemplo el caso de la comparación de dos medias en un diseño en paralelo para la prueba de igualdad. Para efectuar el cálculo

* e-mail: fvillam@icloud.com

es necesario definir las dos hipótesis que van a ser contrastadas: La denominada “hipótesis nula” (H_0) va a ser que no existen diferencias entre las medias de los dos grupos experimentales, es decir $\mu_2 - \mu_1 = 0$. Frente a ella se define la “hipótesis alternativa” (H_1) que es la que quiere probarse: Existe una cierta diferencia entre las medias de ambos grupos experimentales, es decir $\mu_2 - \mu_1 \neq 0$. Los materiales o parámetros necesarios para el cálculo son [2]:

Nivel de significación (α)

El nivel de significación es la probabilidad de un error estadístico de tipo I. Es el que se cometería si se aceptase como cierta la hipótesis alternativa cuando en realidad es falsa (probabilidad de un resultado falso positivo). Habitualmente se adopta como referencia $\alpha = 0,05$ (es decir, que exista un 5% de probabilidades de que en un experimento se observen diferencias entre medias que no se corresponden con la realidad).

Potencia estadística ($1 - \beta$)

Es el complementario de β , el error estadístico de tipo II, que se comete cuando se decide rechazar la hipótesis alternativa cuando en realidad es cierta (probabilidad de un resultado falso negativo). La potencia estadística es por tanto la probabilidad de aceptar la hipótesis alternativa cuando es realmente cierta. Habitualmente se trabaja con una potencia estadística que toma valores entre un 80% y un 90%.

Variabilidad muestral (σ^2)

Se expresa mediante la varianza de la muestra (s^2).

Tamaño de efecto (d)

Es la diferencia mínima que se desea que el experimento pueda detectar entre las medias de los dos grupos experimentales, con un nivel de significación α y una potencia $1 - \beta$. Debe ser una diferencia que aporte significado a la investigación, y dentro de los límites de plausibilidad que marque el modelo experimental que se vaya a utilizar.

Resultados

Vamos a ilustrar los resultados del cálculo del tamaño muestral con el ejemplo descrito en la Tabla 1 y la Tabla 2. Son datos reales de un estudio piloto (nunca publicado) realizado en ratas para medir el cambio en la presión arterial media tras la administración de un cierto tratamiento. La utilidad de este estudio fue la estimación de la variabilidad muestral en las condiciones del experimento, la cual se desconocía. La diferencia entre las variabilidades de los dos grupos experimentales no fue estadísticamente significativa, así que puede aceptarse que la desviación típica común es igual a la total $\sigma = 8,11$, y su varianza $\sigma^2 = 65,77$. Asimismo, dado que el tratamiento consistió en la administración de una sustancia de referencia, de la cual se conocía su efecto, se determinó que un efecto de interés sería obtener al menos una diferencia tan grande como la observada en el estudio piloto, $\mu_2 - \mu_1 \approx 8$ mmHg.

Con estos datos se planteó cuál debería ser el tamaño muestral de un estudio en que se comparase el control con otro tratamiento, y se quisiese detectar una tamaño de efecto igual a 8, asumiendo una varianza muestral igual a 65,77, con un nivel de significación igual a 5%, y una potencia estadística del 80%. Si se entran estos datos en el formulario se obtiene que el tamaño muestral necesario es $N=17$

animales por grupo experimental.

Tabla 1. Resultados de un estudio piloto en que se compara el cambio en la presión arterial media (PAM) a los 10 minutos tras la administración del tratamiento, respecto al valor basal, en ratas.

Grupo Exp.	PAM, cambio en 10 min (mmHg)		
	Media	N	Desv. típ.
Vehículo	3,54	3	8,28
Test	11,60	6	7,20
Total	8,92	9	8,11

Tabla 2. Resultados de la prueba de la t de Student para comparar el cambio en la PAM en los dos grupos experimentales.

t	-1,515
gl	7
Sig. (bilateral)	,174
Diferencia de medias	-8,063
Error típ. de la diferencia	5,322
95% Intervalo de confianza para la diferencia	Inferior -20,647
	Superior 4,521

Discusión

El ejemplo presentado en los resultados es bastante trivial, pero permite empezar la discusión sobre como puede reducirse el número de animales de experimentación. En primer lugar, debe quedar clara la relación que existe entre estos cuatro factores (tamaño de efecto, nivel de significación, potencia estadística y variabilidad) y el tamaño muestral. Una vez hechos los cálculos y decidido qué hacer y cómo, y con cuántos, es como si se hubiese construido una mesa con cinco patas capaz de mantenerse perfectamente estable. La posterior alteración la altura de cualquiera de las cinco patas hará que la mesa cojee. La potencia estadística y la variabilidad de la muestra están directamente relacionados con el tamaño muestral necesario. Por el contrario, el nivel de significación y el tamaño del efecto están inversamente relacionados con el tamaño muestral. Fijados tres de los cuatro parámetros, el cuarto determina el tamaño muestral y entonces la mesa es estable. Alterar cualquiera de los parámetros sin ajustar el resto da como resultado un experimento mal planificado, una mesa coja.

Existe una decisión importante que debe tomarse al inicio de la planificación, y es la referente a la hipótesis de trabajo. Es importante porque ya se ha visto que según cuál sea la hipótesis de trabajo, la fórmula de cálculo del tamaño muestral puede variar y por tanto también el resultado del cálculo. Grosso modo, existen dos tipos de hipótesis alternativas: las denominadas bilaterales, y las unilaterales [3]. Una hipótesis alternativa bilateral, en cuanto a la diferencia entre dos medias se refiere, especifica que se espera que esta diferencia sea distinta de cero, sin importar que sea positiva, o negativa. De ahí la denominación de bilateral. En el experimento del ejemplo se ha optado por una primera aproximación que sería la de realizar una prueba bilateral. Esto puede ser razonable cuando se desconoce el posible efecto del tratamiento. Pero cuando se tiene una idea cierta de cuál podría ser ese efecto o de cuál sería el sentido de las diferencias entre grupos experimentales que tendría sentido biológico, es muy aconsejable plantearse realizar una prueba unilateral. En efecto, se sabe que el tratamiento incrementa el cambio de la PAM respecto al grupo Control, y por tanto cuando se investigue un nuevo producto va a resultar seguramente interesante saber si mejora el resultado del

tratamiento estándar con que se ha realizado el estudio piloto. Por tanto, el efecto que se quiere demostrar que existe es que la diferencia entre las medias del grupo tratado y el grupo control sea superior a 8 mmHg. La hipótesis alternativa será que $\mu_2 - \mu_1 > 0$, y la hipótesis nula será que $\mu_2 - \mu_1 = 0$. Una prueba unilateral es más potente que la correspondiente bilateral. Puede comprobarse que, si se efectúa el cálculo, el resultado es N=13 animales por grupo experimental, para detectar un efecto superior 8 mmHg, con una variabilidad $s^2=65,77$, un nivel de significación del 5% y una potencia estadística del 80% (para quien quiera reproducir el cálculo, deberá doblarse el nivel de significación unilateral deseado al introducir los parámetros en el formulario).

El parámetro de la variabilidad muchas veces es el más difícil de estimar. Debe realizarse el esfuerzo de encontrar el dato en trabajos semejantes publicados con anterioridad. Si ello no es posible, entonces, deberá plantearse la realización de un estudio piloto, con pocos animales, como el que hemos descrito en el ejemplo, con la finalidad de obtener esta estimación de la varianza.

Y una vez conocida la variabilidad muestral, existe otra manera de reducir el tamaño muestral necesario, que es precisamente reducir dicha variabilidad. Ello puede conseguirse de diversas maneras. Si el dato que se va a recopilar depende, por ejemplo, de una intervención sobre el animal, ésta deberá estandarizarse al máximo para evitar que variaciones en la condición inicial del animal provoquen una mayor variabilidad en la respuesta. También puede ser útil plantearse la utilización de una cepa que tenga una menor variabilidad intrínseca (por ejemplo, cepas consanguíneas) [4]. En este aspecto, la creatividad y la pericia del investigador, deben hacerse notar para mejorar la calidad de su reactivo biológico.

Conclusiones

El investigador debe plantearse qué quiere encontrar, cómo quiere hacerlo, qué riesgos de equivocarse puede asumir, y conocer e intentar reducir la variabilidad del material biológico con que va a trabajar. De esta manera podrá calcular el número de animales óptimo para lograr sus objetivos de investigación.

Invertir en la planificación y el diseño experimental es una garantía de que la información que se vaya a obtener será suficiente, y de calidad. Esta inversión es la que hace surgir el orden e invierte la tendencia termodinámica hacia el caos.

Apéndice

Recursos en línea gratuitos que pueden utilizarse para el cálculo de tamaño muestral.

No existe un recurso que cubra todas las necesidades. Muchos se complementan entre sí. Y es una buena práctica efectuar los cálculos en más de uno, para contrastar resultados.

-Sample Size Estimation: <http://www.cct.cuhk.edu.hk/stat/Means.htm>

Es el utilizado para trabajar el ejemplo que se ha utilizado en este artículo. Es muy sencillo, y cubre muchas posibilidades de diseño e hipótesis distintas. Bien documentado.

-G*Power: Statistical Power Analyses for Windows and Mac [5]: <http://www.gpower.hhu.de>

Un programa que hay que descargar e instalar en el ordenador. Muy completo, y bien documentado, en parte, ya que el documento de ayuda está sin terminar.

-PS: Power and Sample Size Calculation: <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/wiki/Main/PowerSampleSize>

Un programa muy sencillo, que tiene la ventaja que los resultados generan un texto en inglés que puede ser usado directamente como justificación del tamaño muestral.

-Java applets for power and sample size [6] <http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>

Una colección de programas en Java que pueden ser ejecutados desde el navegador de Internet o bien descargados y ejecutados directamente desde el ordenador. Muy completo, y bien documentado.

Bibliografía

1. Morowitz, H. J. (1978). Entropía para biólogos. Ed. Hermann Blume. Madrid
2. Hopkins, W. G. (2006). Estimating Sample Size for Magnitude-Based Inferences. *Sports Science* 10:63-70
3. One-tail vs. two-tail P values. En GraphPad Statistics Guide http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?one-tail_vs_two-tail_p_values.htm. Consultado el 9 de noviembre de 2014.
4. Festing, M. F. W. et al (2002). *The Design of Animal Experiments: Reducing the use of animals in research through better experimental design*. SAGE Publications Ltd. Londres.
5. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39:175-191.
6. Lenth, R. V. (2006-9). Java Applets for Power and Sample Size [Computer software]. Consultado el día 9 de noviembre de 2014, desde <http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power>.

Alternativas a los animales de laboratorio en la docencia

Vinardell MP

Dep. Fisiología, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona

Recibido 1 de septiembre de 2014 / Aceptado 26 de septiembre de 2014

Resumen: En este artículo se hace una revisión sobre la utilización de animales y de métodos alternativos en docencia y se constata que todavía se siguen utilizando animales, a pesar de los avances tecnológicos que permiten cada vez métodos mejores y más efectivos para reemplazar a los animales en las prácticas docentes. Así mismo se analizan las ventajas y las limitaciones que pueden presentar estos métodos y se hace una revisión bibliográfica de los últimos artículos publicados en este sentido. A pesar, de existir muchos docentes que utilizan métodos alternativos, no existen demasiados artículos que nos informen de la situación de las alternativas ni tampoco de los beneficios que aportan a los estudiantes.

Palabras clave: docencia, animales de laboratorio, simuladores, *in vitro*, auto-experimentación

Abstract: Alternatives to laboratory animals in education. This paper is a review on the use of laboratory animals and alternative methods in education. Laboratory animals are still used despite technological advances that allow better alternative methods and more effective to replace animals in laboratory practices. Moreover, we analyze the advantages and limitations of these alternative methods and we review the literature of the last years in this field. Although, there are many teachers who use alternative methods, there are not too many papers giving information about the real situation of alternatives neither the benefits for students

Key words: education, laboratory animals, computer simulations, *in vitro*, self-experimentation

Introducción

Desde que en 1959 Russell y Burch describieron el principio de las 3Rs (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) de los animales de laboratorio, en su libro “The principles of Humane experimental technique” [1], se han producido numerosos cambios en la utilización de los mismos, tanto en el ámbito de la investigación como de la docencia. En los últimos años se ha reducido el número de animales utilizados para fines docentes, si bien, todavía se utilizan numerosos animales de laboratorio. Así en el último informe de la Comisión Europea sobre los animales utilizados en Europa en el año 2011, se puede ver como se ha pasado a un total 179.981 animales, que representa un 1.56% del total de animales utilizados (Figura 1) [2]. Este valor se ha reducido a la mitad respecto al año 2002 en que representaba un 3% del total (Figura 2).

Este número de animales, en realidad es superior, ya que en esta cifra no se contabilizan, por ejemplo, a aquellos animales que han sido sacrificados previamente para realizar algún procedimiento en

prácticas de laboratorio. En muchos casos estos números no son bien conocidos, pues en algunos países no se informa adecuadamente del uso de animales en docencia, si bien cada vez los datos aportados por los diferentes países son más fiables.

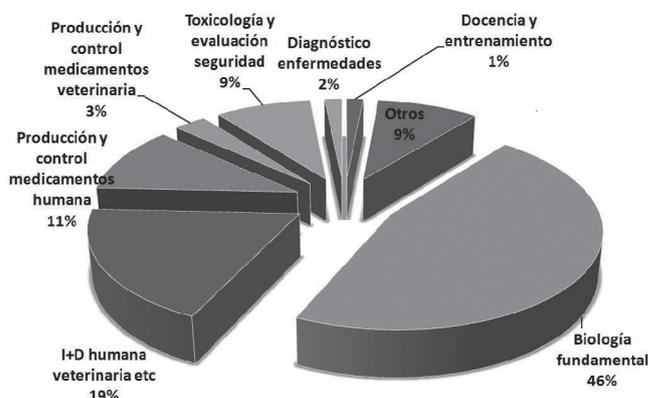


Figura 1. Distribución de animales utilizados con diferentes finalidades en la Unión Europea en el año 2011, adaptado del informe de la Comisión Europea [2]

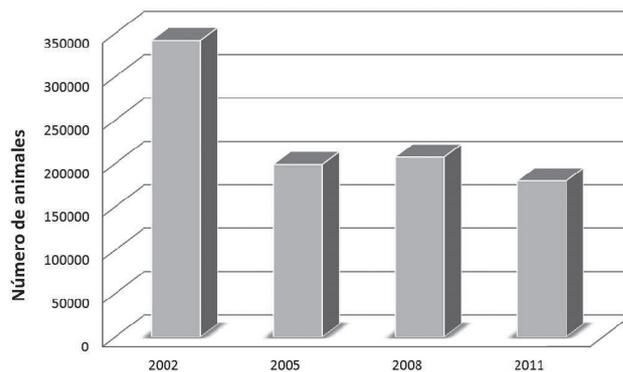


Figura 2. Evolución del número de animales utilizados con fines docentes en la Unión Europea desde 2002 hasta 2011, adaptado del informe de la Comisión Europea [2]

La disminución del número de animales utilizados para educación y formación puede atribuirse a la aplicación de técnicas alternativas y a la reutilización de animales, si bien todavía resulta elevado.

En cuanto a las especies utilizadas, se observa en dicho informe que la mayoría son ratones y ratas (Tabla 1, Figura 3)

En algunas materias como Farmacología, Fisiología, Toxicología o

* e-mail: mpvinardellmh@ub.edu

Anatomía, se realizan prácticas de laboratorio que implican el uso de animales o sus tejidos. En muchos casos, los objetivos de estas clases están poco definidos, y en otros se habla de la necesidad de aprender habilidades prácticas y de laboratorio, habilidades relacionadas con la manipulación de animales, y la disección o cirugía. También se indica que este tipo de prácticas son importantes para reforzar los conocimientos adquiridos en clases teóricas, aprender a hacer mediciones, toma de datos, análisis, representación e interpretación de los mismos. También para adquirir habilidades relacionadas con la comunicación oral y escrita y para desarrollar actitudes responsables hacia los animales de experimentación.

Tabla 1. Número total de animales de diferentes especies utilizados en la docencia y el entrenamiento en Europa durante el año 2011, según el último informe de la Comisión Europea [2]

Especie	Nº de animales
Ratón	82167
Rata	48152
Otros roedores	4234
Conejos	2068
Carnívoros	1149
Herbívoros	14297
Monos	209
Otros mamíferos	26
Pájaros	3025
Animales de sangre fría	24654
Total	179981

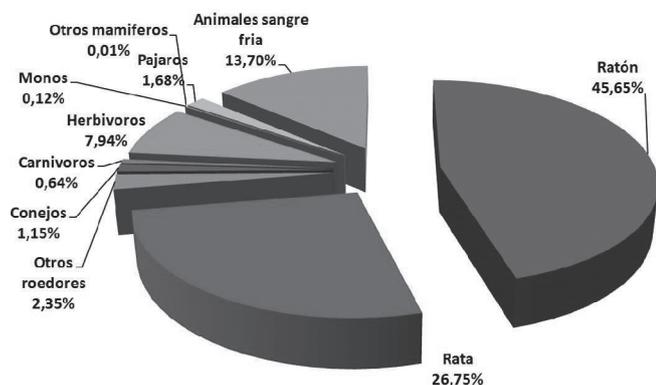


Figura 3. Distribución por especies del número de animales utilizados con fines docentes en la Unión Europea en el año 2011, adaptado del informe de la Comisión Europea [2]

Estos objetivos son importantes, pero en la mayoría de casos también se pueden alcanzar utilizando métodos alternativos [3].

Aspectos legales del uso de animales de laboratorio en docencia

La Directiva 2010/63/EU del Parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 [4] relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos es la que regula a nivel europeo el uso de animales de experimentación y que sustituyó a la anterior Directiva 86/609/CEE. Esta directiva se basó en el Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos en el que ya se

especificaba en el artículo 25: “aquellos procedimientos llevados a cabo con fines educativos o de entrenamiento se deben restringir a los absolutamente necesarios para los fines relativos a la enseñanza y el entrenamiento y se permitirán únicamente si sus objetivos no pueden ser conseguidos con métodos audiovisuales u otros que sean suficientemente efectivos”.

A nivel español la directiva se traspuso a la ley en forma del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia [5].

Recientemente, en febrero de 2014 se ha publicado un documento sobre la aplicación de la Directiva 2010/63/EU sobre animales de experimentación con finalidades docentes y de entrenamiento. Dicho documento está destinado a servir de guía a los diferentes países miembros de la Unión Europea en la aplicación de dicha directiva [6]. En primer lugar se distingue entre la docencia y el entrenamiento ya que cada caso implica unas connotaciones diferentes en cuanto al uso de animales de laboratorio. Se destaca que en todos los casos que suponga dolor, o sufrimiento para los animales se necesita una autorización específica. Cuando se solicita dicha autorización, es necesario indicar que se ha explorado la posibilidad de utilizar alternativas y se han de definir muy bien los beneficios del uso de animales respecto a modelos sin animales.

Clasificación de los métodos alternativos en docencia

El desarrollo de métodos alternativos para la docencia no es nuevo y así en el informe de la reunión de expertos en métodos alternativos en docencia, organizado por ECVAM en 1999 [7], ya se identificaron varios tipos de métodos: a) modelos y maniquíes b) películas y vídeos c) simulaciones de ordenador y sistemas de realidad virtual d) auto-experimentación en el propio individuo, e) experimentos con plantas f) uso de material procedente de mataderos g) estudios *in vitro* con líneas celulares h) aprovechamiento de animales muertos de forma natural o utilizados después de un procedimiento científico i) práctica clínica. Entre las propuestas de alternativas que se suelen utilizar, especialmente en las facultades de veterinaria es la utilización ética de cadáveres procedentes de donaciones desinteresadas [8,9]. Recientemente se han hecho otras propuestas como es la utilización de invertebrados [10], así como el uso de tejidos procedentes de animales de consumo (ej.: muslo de pollo, etc.) para la enseñanza de microcirugía, sin necesidad de utilizar animales de laboratorio [11,12].

Los métodos alternativos presentan ciertas ventajas respecto al uso de animales. En aquellos casos en que los estudiantes no están suficientemente preparados para trabajar con animales, puede resultar una experiencia desagradable el enfrentarse al sufrimiento y sacrificio de los animales. Cuando se realiza un experimento con animales, en la mayoría de los casos únicamente se puede realizar una vez ya que si se tiene que repetir implica un mayor coste y tiempo. Por el contrario, un método alternativo se puede repetir las veces que sea necesario, hasta que el estudiante comprenda aquello que representa el fundamento de la práctica que está realizando. Los métodos alternativos evitan la experiencia negativa de aquellos experimentos que no se han podido realizar adecuadamente o han dado datos ambiguos. Los métodos alternativos, en especial los basados en programas de ordenador, pueden incluir preguntas para el auto-aprendizaje y la valoración del grado de comprensión del procedimiento a estudiar. Aquellos que utilizan técnicas audiovisuales modernas permiten la posibilidad de demostrar

fenómenos que no son observables en los experimentos con animales, como por ejemplo la observación de animaciones sobre las funciones celulares o de los órganos.

Las simulaciones para ordenador, a pesar de que resultan costosas al principio y es la excusa para que algunos profesores no las implementen, tienen muchas ventajas. Entre ellas se puede citar que el estudiante puede aplicar diferentes variables en un corto período de tiempo, pueden proporcionar una retroalimentación y numerosas ayudas, los experimentos se pueden repetir tantas veces como se quiera y en cualquier sitio. Su coste-efectividad es mejor que en el caso de los animales y por último estimula la creatividad del profesor comparada con métodos convencionales como la disección [13].

Los métodos de auto-experimentación resultan muy útiles cuando estudiamos Fisiología, pues permiten al estudiante hacer determinadas mediciones sobre su propio cuerpo. Ejemplos los tenemos en las determinaciones de presión arterial, ritmo cardíaco, electromiografía etc. Este tipo de prácticas de laboratorio son muy bien aceptadas por los estudiantes [14].

Es indudable que actualmente existe un gran número de métodos alternativos y resulta difícil elegir entre los que se nos ofrece. En la web (<http://Buscaalternativas.com>) [15], se ha hecho una recopilación exhaustiva de diferentes páginas web sobre métodos alternativos. En dicha página se explica cómo hacer una búsqueda de métodos alternativos y las estrategias de búsqueda. En relación con las alternativas en docencia, existen enlaces con bases de datos sobre docencia y también diferentes simulaciones gratuitas que pueden ser de utilidad para el profesorado interesado en implantar métodos alternativos en sus clases.

Una buena base de datos que aporta información al respecto es NORINA (http://oslovet.norecopa.no/fag.aspx?fag=57&mmu=databases_1) [16]. Se trata de una base de datos en inglés con información sobre unas 3500 alternativas al uso de animales en docencia y entrenamiento desde la escuela hasta la universidad. Esta información se ha recopilado desde 1991 y se va actualizando periódicamente. Se puede hacer una búsqueda por diferentes categorías de alternativas y para diferentes disciplinas que impliquen uso de animales de laboratorio. Desde 2011 se encarga de la base de datos Norecopa (Norwegian consensus platform for replacement, reduction and refinement of animal experimentation) y el proyecto está financiado actualmente por Nordisk Samfunn mot Smertevoldende Dyreforsøk. También cuenta con otra base de datos TextBase con información sobre más de 1500 libros sobre animales de laboratorio.

Otra buena fuente de información sobre métodos alternativos en educación es INTERNICHE (<http://www.interniche.org>) [17] que constituye una red internacional sobre educación humanitaria. Esta organización promueve el uso de métodos alternativos en todo el mundo. También dispone de un sistema de préstamo de métodos alternativos, pensado para que el profesorado pueda ver y probar los diferentes métodos, antes de su adquisición para ser utilizados por sus estudiantes. También existe un libro "*from Guinea Pig to Computer Mouse: Alternative methods for a progressive, humane education*" que recoge todas las alternativas en el mercado, con explicaciones sobre las mismas, el suministrador, precio, etc. [18]. El libro está traducido a diferentes idiomas, francés, alemán, italiano, español, portugués, portugués brasileño, ruso, árabe, chino mandarín y japonés y actualmente está en su segunda edición.

Cuando un profesor, se plantea el reemplazo de las prácticas tradicionales con animales, por algún método alternativo, se

encuentra que tiene que elaborar su propio material o recurrir a los existentes en el mercado. La elaboración de un material docente alternativo, constituye un gran trabajo y una dedicación exclusiva y no todos los profesores estamos capacitados para realizarlo, utilizando determinadas herramientas informáticas, además del elevado coste de realización. Es por ello que una solución es la utilización y adaptación de material ya existente. En ese caso nos encontramos con una gran cantidad de material del cual es difícil diferenciar el bueno del malo, si no se puede consultar con suficiente tiempo y analizar su posible utilización para el fin de nuestras prácticas. Con la finalidad de servir de guía para el profesorado, durante un tiempo existió una red europea de profesores interesados en los métodos alternativos denominada EURCA que realizaba una revisión de los diferentes métodos dando información más detallada a los profesores [19,20]. Por desgracia, dicho proyecto dejó de estar activo en el momento que desapareció la financiación que permitía su funcionamiento.

A pesar de la existencia de gran número de métodos alternativos, existen todavía problemas relacionados con su introducción. En primer lugar existe una resistencia por parte de algunos profesores para cambiar su opinión sobre los métodos alternativos y necesitan ser convencidos de las ventajas de la utilización de alternativas. En muchos casos consideran los métodos alternativos de menor calidad docente que las prácticas tradicionales con animales [21,22].

Beneficios de los métodos alternativos en docencia

Sin considerar los aspectos éticos, no existen demasiados estudios comparativos sobre los beneficios de un método alternativo y un método con animales [23,24]; La incorporación de métodos alternativos en las clases prácticas comprende una inversión inicial de tiempo y dinero. Por otro lado, no existe una buena información sobre el material existente ni sobre la calidad del mismo. En el año 2007 se publicó un estudio retrospectivo de los trabajos publicados entre 1996 y 2004 en Estados Unidos, en los que se comparaban los resultados obtenidos entre estudiantes que utilizaban métodos tradicionales con animales y métodos alternativos. Se contabilizaron 17 estudios de los cuales 5 correspondían a estudiantes de Veterinaria, 3 a estudiantes de Medicina, 6 a estudios universitarios de diferentes disciplinas y 3 a estudiantes preuniversitarios de Biología. El número de estudiantes en cada estudio estaba entre 14 y 283. A pesar que el número de estudios y estudiantes no era elevado los resultados académicos parece no diferir en los grupos que utilizan animales y los que no utilizan animales [25].

Los enormes avances en la informática y en la tecnología de la información han producido un cambio en el sistema educativo. Existen métodos novedosos para enseñar Anatomía, Fisiología y otras disciplinas en diferentes formatos como los modelos tridimensionales, las simulaciones para ordenador, videos, etc. Los profesores han empezado a darse cuenta que los estudiantes pueden aprender igual utilizando esta moderna tecnología [7].

Una de las disciplinas que tradicionalmente ha utilizado animales es anatomía, en la que se realizaba la disección de animales, siendo una de las prácticas que más debates ha desencadenado. En muchos casos en ciencias básicas la práctica de anatomía aporta pocos conocimientos y a pesar que el estudiante adquiera habilidades estas tienen poca relevancia para sus carreras futuras [26]. Una de las alternativas propuestas es la sustitución de la disección de gatos por un modelo plastificado humano. En un trabajo previo se observó que los estudiantes que realizaban su aprendizaje con el modelo plastificado obtenían mejores puntuaciones que los que realizaban

una disección tradicional en gato [24]. Al final de dicha experiencia los estudiantes que utilizaron gatos consideraron que era más efectiva respecto a su opinión inicial, mientras los que utilizaron modelos, no variaron su apreciación respecto al inicio. A pesar de que en ese estudio no parecía que los estudiantes apreciaran el uso de alternativas, en un trabajo similar realizado recientemente y en condiciones similares se observó que los modelos plastificados eran la técnica preferida por los estudiantes en su percepción subjetiva de su experiencia de aprendizaje [27]. Estos últimos resultados parecen cambiar la opinión de los estudiantes a favor del uso de alternativas.

Otro tipo de alternativas que ha sido estudiada en cuanto a su eficacia es la utilización de un CD para el autoaprendizaje en veterinaria. En este caso concreto se compararon estudiantes que utilizaron un programa de ordenador para aprender a introducir una sonda nasogástrica en caballos y los que observaron como lo hacía el profesor directamente en el animal. Al final del proceso se observó cómo los estudiantes que habían aprendido con el CD obtenían mejor puntuación en el test de conocimiento y también realizaban mejor la maniobra [28].

Otros estudios han mostrado el grado de satisfacción de los estudiantes con experimentos virtuales en Farmacología, si bien en algunos casos preferían realizar tanto experimentos virtuales como con animales ya que consideraban que necesitaban estos últimos si se iban a dedicar a la investigación [29]. En general, los estudiantes se sienten más confiados si utilizan métodos alternativos [30].

En la utilización de métodos alternativos en docencia, juega un papel importante el profesor. Este tiene que saber transmitir al estudiante la necesidad de sustituir los animales por otros métodos, de una manera adecuada, además de explicarle previamente todos los aspectos éticos y legales del uso de animales de laboratorio.

Limitaciones del uso de métodos alternativos en docencia

El impacto y las ventajas educativas de los sistemas de aprendizaje basados en el uso de ordenador para simular experimentos en Farmacología y otras disciplinas biomédicas en educación superior ha estado muy bien documentado [31-33]. La mayoría de estos programas se desarrollaron en los años 90 como aplicaciones multimedia y suministradas por universidades en formato CD, a través de servidores locales. En la mayoría de los casos se utilizaban programas comerciales autorizados. Estas tecnologías han cambiado de DOS a Windows y de procesadores más lentos a procesadores más rápidos y a pantallas de mayor resolución y continúa cambiando muy deprisa.

Estos cambios representan que muchos programas cuyo contenido educativo es todavía válido, pero las tecnologías han quedado obsoletas con posibilidades de que se pierdan definitivamente.

Con las posibilidades actuales de acceso a internet existe una demanda de los estudiantes para poder acceder a los recursos educativos desde cualquier parte y a través de webs.

La utilidad de los programas depende de la proximidad del programa a las necesidades del profesor y a la capacidad para adoptar materiales desarrollados en cualquier parte. Los profesores en general no tienen habilidades ni tiempo para desarrollar sus propios programas y es difícil adaptar los programas a sus propias necesidades. En la actualidad los profesores necesitan materiales docentes basados en webs y que puedan ser editados por los profesores según sus necesidades [34].

Una de las principales limitaciones del uso de métodos alternativos, es que en muchos casos se tratan de programas que se encuentran en

inglés y esto dificulta el aprendizaje de los estudiantes [35]. Por ello hay que destacar las iniciativas de diferentes universidades para la elaboración de su propio material en el idioma propio del país.

Podemos poner ejemplos como la realización de videos para prácticas de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de Madrid. Tal como indican los autores las ventajas que se consiguen con estos videos son: la disminución del número de animales utilizados, la posibilidad de utilización del material audiovisual durante varios años, la utilización del material audiovisual en distintos espacios físicos: clases, seminarios, prácticas, consultas, aulas de informática, etc, y el uso de mejores técnicas pedagógicas [36]. Evidentemente, existen más trabajos en los que se desarrollan alternativas, pero no han sido publicados y es difícil tener conocimiento de su existencia, a no ser que sea a través de congresos en los que se presentan estos trabajos. Se debería animar al profesorado que ha desarrollado métodos alternativos o que los aplica en su docencia a hacer partícipes a la comunidad universitaria de sus actividades en este campo.

Pero la gran limitación para el uso de métodos alternativos en docencia, todavía es la reticencia de muchos profesores que no ven o quieren ver las ventajas de estos métodos y que todavía defienden la necesidad de utilizar animales de laboratorio en las prácticas, justificándolas como fundamentales para la formación de sus estudiantes.

Existe un desconocimiento de los propios profesores sobre la introducción de las 3Rs en docencia, tal como se desprende de un estudio realizado en Alemania [37]. En este estudio se observó que una gran mayoría de los docentes no estaban interesados en implementar estos métodos.

Toda esta reticencia se eliminaría si existiera una buena difusión del principio de la 3Rs entre los docentes. En este sentido la reunión de expertos internacionales que organizó el Center for Alternatives to Animal Testing in Europe (CAAT-Europa) conjuntamente con Transatlantic Think Tank for Toxicology (t4) evidenció dichos aspectos y limitaciones en la introducción del concepto de 3Rs [38].

Avances en la implementación de métodos alternativos en docencia

En diferentes facultades se van introduciendo los métodos alternativos. En el caso de las facultades de Veterinaria, los profesores preparan a los estudiantes para la práctica veterinaria que requiere la utilización de animales y el entrenamiento en su uso, así como en la administración de anestesia que es fundamental. Sin embargo, el consumo de animales en los laboratorios está cada vez más regulado y el número de animales está disminuyendo en los últimos años. Estos cambios se están dando en la mayoría de facultades de Veterinaria en Estados Unidos [39], siendo la Universidad de California la pionera en este cambio [40].

Se han hecho varios estudios sobre la implementación de métodos alternativos en diferentes países [41-51] (Tabla 2). A pesar que se están introduciendo los métodos alternativos, todavía, en muchos casos, se observa un desconocimiento por parte de los profesores y de los estudiantes en cuanto a la existencia de métodos alternativos y el propio concepto de 3Rs, tal como se ha mencionado anteriormente y en muchos casos también hay un desconocimiento de la legislación referente al uso de animales de laboratorio.

Tabla 2. Resumen de la bibliografía sobre la implementación de los métodos alternativos en docencia en diferentes países.

Países	Autores y Año	Referencia
India	Badyal y col. 2011	26
	Sathyarayanan 2013	13
	Shehnaz et al.	47
España	Vinardell 2012	14
Europa del Este	Dewhurst DG, Kojic ZZ. (2011)	39
Estados Unidos	Hart y col 2005, 2004	40,41
Corea	Lee y col. 2010	42
	Choe y, Lee 2013	43
Kenia	Kimwele y col. 2011	44
Brasil	Deguchi y col. 2012	45
México	Perez-Rivero y Rendon-Franco 2012	46
Australia	Whittaker y Anderson, 2013	48
China	Kong y Qin 2010	49
Balcanes	Kojic y Dewhurst, 2009	50
Rusia	Jukes 2008	51

Conclusiones

A pesar que cada vez se están perfeccionando más, las simulaciones modelos para ordenador, así como los modelos y otras alternativas utilizadas en las prácticas docentes para reemplazar a los animales de laboratorio, todavía se siguen utilizando estos en muchas universidades de todo el mundo. En los últimos años se han publicado diversos estudios mostrando las ventajas de los métodos alternativos, así como la implantación de los mismos. Se han podido constatar las ventajas de las alternativas respecto a los métodos tradicionales con animales, pero todavía existe una cierta reticencia por parte del profesorado a su utilización. Es necesario realizar un esfuerzo para difundir estos métodos entre la comunidad universitaria.

Bibliografía

- Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of Humane experimental technique. http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.
- European Commission (2013) Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union. http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:d2e73ac5-6d0d-11e3-ab0f-01aa75ed71a1.0001.01/DOC_1&format=PDF.
- Vinardell MP (2007) Actividades de Eurca (European Resource Center for Alternatives in Higher Education) en el desarrollo e implantación de métodos alternativos al uso de animales en docencia. *Edusfarm*, Núm. 2. <http://www.publicacions.ub.es/revistes/edusfarm2/documentos/131.pdf>.
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Diario Oficial de la Unión Europea L 276/33. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:ES:PDF>.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. BOE Núm. 34, 8 de febrero de 2013 Sec. I. Pág. 11370.
- National Competent Authorities for the implementation of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. A working document on the development of a common education and training framework to fulfil the requirements under the Directive Replacing consensus document Brussels, 19-20 February 2014. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Endorsed_E-T.pdf.
- van der Valk J, Dewhurst D, Hughes I., et al. (1999) Alternatives to the use of animals in higher education: the Report and recommendations of ECVAM workshop. *ATLA* 27: 39-52.
- Martinsen S, Jukes N (2007) Ethically sourced animal cadavers and tissue: Considerations for education and training. *AATEX* 14, Special Issue, 265-268.
- Jukes N. (2014) Ethical animal use in education and training: from clinical rotations to ethically sourced cadavers. *Altern Lab Anim.* 42:9-12.
- Wilson-Sanders SE (2011) Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR J.* 52:126-52.
- Olabe J, Olabe J (2009) Microsurgical training on an *in vitro* chicken wing infusion model. *Surg Neurol.* 72:695-699.
- Cigna E, Bistoni G, Trignano E, Tortorelli G, Spalvieri C, Scuderi N (2010) Microsurgical teaching: our experience. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 63:529-531.
- Sathyarayanan MC (2013) Need for Alternatives for Animals in Education and the Alternative Resources ALTEX Proceedings 2:77-82.
- Vinardell MP (2012) Challenges of Using Alternatives to Animals in Laboratory Classes in Physiology: the Spanish Experience. *ALTEX Proceedings*, 351-352.
- Repetto G, del Peso A (2014) Estrategias de identificación de planteamientos alternativos en/y a la experimentación animal. *Rev Toxicol* 31:108-114. *Busca alternativas.* <http://buscaalternativas.com>
- NORINA (http://oslovet.norecopa.no/fag.aspx?fag=57&mnu=databases_1)
- INTERNICHE (<http://www.interniche.org>)
- Jukes N, Chiuia M (2003) From Guinea Pig to Computer Mouse: Alternative Methods for a Progressive, Humane Education, 2nd edition, 520pp. Leicester, UK: InterNICHE.
- de Boo J, Dewhurst D, van der Valk J (2004) The European Resource Centre for Alternatives in Higher Education. *ATLA:* 32:603-605.
- Boxel MV, Dewhurst D, der Valk JV (2005) The European Resource Centre for Alternatives in higher education (EURCA) *ALTEX:*22:36.
- Balcombe JP (1997) Alternatives in education: overcoming barriers to acceptance. In *Animal Alternatives, Welfare and Ethics* (ed. L.F.M. van Zutphen & M. Balls), pp. 441-444. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Balcombe JP (1997) Student/teacher conflict regarding animal dissection. *The American Biology Teacher* 59: 22-25.
- Dewhurst DG, Hardcastle J, Hardcastle PT, Stuart E (1994) Comparison of a computer simulation program and a traditional laboratory practical class for teaching the principles of intestinal

- absorption. *Am J Physiol.* 267:95-104.
24. Waters JR, Van Meter P, Perrotti W, Drogo S, Cyr RJ (2005) Cat dissection vs. sculpting human structures in clay: an analysis of two approaches to undergraduate human anatomy laboratory education *Adv Physiol Educ* 29:27-34.
 25. Patronek GJ, Rauch A (2007) Systematic review of comparative studies examining alternatives to the harmful use of animals in biomedical education. *J Am Vet Med Assoc.* 230:37-43.
 26. Akbarsha MA (2007) Movement to curtail animal dissections in Zoology curriculum: Review of the Indian experience. *ALTEX* 24:163-166.
 27. DeHoff ME, Clark KL, Meganathan K (2011) Learning outcomes and student-perceived value of clay modeling and cat dissection in undergraduate human anatomy and physiology *Adv Physiol Educ* 35:68-75.
 28. Abutarbush SM, Naylor JM, Parchoma G, D'Eon M, Petrie L, Carruthers T (2006) Evaluation of traditional instruction versus a self-learning computer module in teaching veterinary students how to pass a nasogastric tube in the horse. *J Vet Med Educ.* 33:447-454.
 29. Badyal DK, Modgill V, Kaur J (2011) Computer simulation models are implementable as replacements for animal experiments. *Altern Lab Anim.* 37:191-195.
 30. Babu CS, Latha K, Thirunavukkarasu J, Tharani CB (2011) Virtual experimental Pharmacology and alternative or not? A global assessment by Pharmacology faculties and MBBS students. *Recent Research in Science and Technology* 3:25-29
 31. Knight A (2007) Humane teaching methods proves efficacious within veterinary and other biomedical education. *ALTEX* 14:213-220.
 32. Gruber FP and Dewhurst DG (2004) Alternatives to Animal Experimentation in Biomedical Education. *ALTEX* 21:33-48.
 33. Dewhurst D (2006) Computer based alternatives – past, present and future. *Alternatives to Animal Experimentation ALTEX* 23:197-201.
 34. Knight A (2007) The effectiveness of humane teaching methods in veterinary education. *ALTEX* 24:91-109.
 35. Dewhurst D, Cromar S, Ellaway R (2007) A new model for developing computer-based alternatives to using animals in tertiary education. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation AATEX* 14:239-242.
 36. Lorenzo González PL, Revuelta Rueda L, Silván Granado G, Illera del Portal JC. (2005) Desarrollo de métodos audiovisuales e informáticos para la integración de prácticas de Fisiología Animal en el curriculum veterinario. In *II Jornada Campus Virtual UCM: cómo integrar investigación y docencia en el CV-UCM*. Editorial Complutense, Madrid, pp. 171-175.
 37. Schmidt A, Hohensee C, Teichgräber U, Schmidt A (2011) SATIS ethics ranking of universities in Germany regarding animal use in education. *ALTEX* 28:243-244.
 38. Daneshian M, Akbarsha MA, Blaauboer B, Caloni F, Cosson P, Curren R, Goldberg A, Gruber F, Ohl F, Pfaller W, van der Valk J, Vinardell P, Zurlo J, Hartung T, Leist M (2011) A Framework Program for the Teaching of Alternative Methods (Replacement, Reduction, Refinement) to Animal Experimentation. *ALTEX* 28:341-352.
 39. Dewhurst DG, Kojic ZZ (2011) Replacing animal use in physiology and pharmacology teaching in selected universities in Eastern Europe--charting a way forward. *Altern Lab Anim.* 39:15-22.
 40. Hart LA, Wood MW, Weng HY (2005) Mainstreaming alternatives in veterinary medical education: resource development and curricular reform. *J Vet Med Educ.* 32:473-480.
 41. Hart LA, Wood MW (2004) Uses of animals and alternatives in College and Veterinary Education at the University of California, Davis: institutional commitment for mainstreaming alternatives. *32 Suppl 1B:617-620.*
 42. Lee GH, Choe BI, Kim JS, Hart LA, Han JS (2010) The current status of animal use and alternatives in Korean veterinary medical schools. *Altern Lab Anim* 38:221-230.
 43. Choe BI, Lee GH (2013) Searching and review on the Three Rs information in Korea: time for quality assessment and continued education. *BMB Rep.* 46:335-7
 44. Kimwele C, Matheka D, Ferdowsian H (2011) A Kenyan perspective on the use of animals in science education and scientific research in Africa and prospects for improvement. *Pan Afr Med J.* 9:45.
 45. Deguchi BG, Molento CF, de Souza CE (2012) The perception of students on the use of animals in higher education at the Federal University of Paraná, Southern Brazil. *Altern Lab Anim.* 40:83-90.
 46. Perez-Rivero JJ, Rendon-Franco E (2012) Experience of the use of table-top simulators as alternatives in the primary surgical training of veterinary undergraduate students. *Altern Lab Anim.* 40:10-11.
 47. Shehnaz SI, Sreedharan J, Arifulla M, Gomathi KG (2012) Do faculty in Southern Indian medical colleges support animal use in postgraduate education more than in undergraduate education? *Altern Lab Anim.* 40:165-74.
 48. Whittaker AL1, Anderson GIJ (2013) A policy at the University of Adelaide for student objections to the use of animals in teaching *Vet Med Educ.* 40:52-57.
 49. Kong Q, Qin C (2010) Laboratory animal science in China: current status and potential for adoption of Three R alternatives. *Altern Lab Anim.* 38:53-69.
 50. Kojic ZZ1, Dewhurst DG (2009) The impact of introducing computer-based alternatives to the use of animals in the teaching of physiology and pharmacology at Balkan universities - a pilot study. *Altern Lab Anim.* 37:547-56.
 51. Jukes N (2008) Russia: update on animal experiments and alternatives in education. *ALTEX.* 25:56-62.

Avances en la evaluación de la sensibilización dérmica mediante métodos alternativos

Alejandro A*, García-Bilbao A, Aristimuño C

Centro Tecnológico Gaiker-IK4. Parque Tecnológico Ed.202. 48170 Zamudio, Bizkaia, Spain.

Recibido 11 de septiembre de 2014 / Aceptado 20 de octubre de 2014

Resumen: La sensibilización dérmica constituye uno de los efectos adversos sobre la piel más común en las enfermedades laborales y que además afecta a toda la población al ser causada por productos químicos que son frecuentemente utilizados en el hogar, tanto aquellos destinados a la limpieza como a los productos de higiene personal. La necesidad de evaluar el posible daño que puede causar un agente químico sobre la piel, en lo que conocemos como sensibilización dérmica, está recogido en las distintas legislaciones relacionadas con la evaluación del riesgo para la salud derivado de la comercialización de productos químicos: REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of chemicals), Biocidas, Cosméticos... Actualmente los métodos aprobados por la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) utilizando animales, son los únicos capaces de evaluar el daño, por una parte, y clasificar un potencial sensibilizante, por otra. Los esfuerzos en investigación realizados en los últimos años, junto con el empuje de EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing) han permitido validar métodos *in vitro* que, aunque no sustituyen totalmente los ensayos con animales al evaluar solo un evento dentro del proceso de sensibilización (DPRA, KeratinoSens y h-CLAT), sí pueden formar parte de una estrategia integrada con la cual poder evaluar el riesgo que supone para la salud la utilización de potenciales sensibilizantes dérmicos. La experimentación que se llevará a cabo en los próximos años aportará importantes novedades en este apartado.

Palabras Clave: Sensibilización dérmica, métodos alternativos, evaluación del riesgo.

Abstract: Progresses in the skin sensitization assessment using alternative methods. Skin sensitization is one of the most common adverse effects on skin in occupational diseases. It affects the whole population and it is caused by household chemical products, used as much as in cleaning as in personal hygiene. According to the legislation related to health risk assessment resulting from chemical products commercialization (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of chemicals (REACH), biocides, cosmetics...) it is necessary to evaluate the possible damage that a chemical may cause onto skin. This is known as skin sensitization. Nowadays, animal test methods officially accepted by the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) are the only ones capable of evaluate the risk on one side, and classify a potential sensitizer on the other. However, the development and validation of *in vitro* methods to evaluate skin sensitization are improving steadily with contributions from the EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing). Despite these methods (DPRA, KeratinoSens™ y h-CLAT) are relatively static and focus

only in one event of the skin sensitization process, they may become part of an integrated testing strategy for the risk assessment of potential skin sensitizers. Further testing over the coming years will bring significant advances in this field.

Key Words: Skin sensitization, alternative methods, risk assessment.

Introducción

La piel es el órgano más extenso del cuerpo. Además de actuar como escudo protector contra el calor, la luz, lesiones e infecciones, la piel posee otras propiedades esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares. Esta barrera protectora, mantiene la integridad del cuerpo, absorbe y elimina líquidos, regula la temperatura, impide la pérdida y entrada de agua, absorbe y filtra radiaciones (UV), metaboliza la vitamina D, tiene funciones sensitivas, impide la entrada de microorganismos, etc... [1].

Las enfermedades que afectan a la piel, aunque estadísticamente no representan una de las primeras causas de mortalidad en el mundo, ocupan un lugar importante en cuanto al número de personas que se ven afectadas y la alteración en la calidad de vida que suponen. En España representan aproximadamente el 6% de las enfermedades profesionales declaradas [2]. Muchas de estas enfermedades no suponen un riesgo mortal para la salud, pero sí conllevan una menor calidad de vida a los que las padecen, y necesitan del tratamiento médico adecuado. Por ello, resulta imprescindible conocer los mecanismos biológicos implicados así como disponer de métodos que permitan la evaluación de los posibles efectos adversos sobre la piel.

El progreso técnico llevado a cabo por la industria, la agricultura o la minería está directamente relacionado con el desarrollo de enfermedades de la piel. Así, los primeros efectos nocivos descritos fueron ulceraciones de la piel causadas por sales metálicas en la minería [3]. El descubrimiento de nuevos materiales y su posterior utilización, han provocado una alteración en la salud de la piel de las personas. En la actualidad, se han identificado más de 4000 productos como sensibilizantes dérmicos y se ha calculado que en Europa la tasa de prevalencia de la enfermedad está comprendida entre 7,2 y 18,6% con una incidencia cada vez más en aumento debido a las repetidas exposiciones a sensibilizantes [4].

Tanto los productos químicos medioambientales como aquellos que se utilizan en el hogar (para limpieza o higiene personal), entran en contacto con la piel y, en algunos casos, pueden tener efectos no deseados. Entre estos efectos se podrían citar la acción irritante al aplicar el producto directamente sobre la piel, el efecto fotoirritante cuando tras su aplicación incide la luz ultravioleta-visible del sol o bien un efecto sensibilizante causado por alguno de los componentes

* e-mail: alejandro@gaiker.es

tras repetidas exposiciones al mismo.

Sensibilización dérmica es un término utilizado para describir a nivel regulatorio los daños conocidos como dermatitis de contacto alérgica (Allergic Contact Dermatitis, ACD) o hipersensibilidad por contacto, un importante punto a tener en consideración en la evaluación del daño y del riesgo de los productos químicos. De acuerdo a la definición de la Unión Europea: un sensibilizante dérmico es una sustancia que causa una respuesta alérgica como consecuencia del contacto con la piel [5].

La información sobre el potencial de sensibilización de las sustancias representa un requisito esencial en la protección de la salud y el medioambiente y queda reflejada en la legislación promovida por la Unión Europea.

La Legislación REACH (EC) n° 1907/2006, relativa al Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de productos químicos es de aplicación para todas las sustancias químicas, tanto las utilizadas en procesos industriales como las contenidas en productos de consumo. Para cumplir con la legislación, las empresas deben identificar y comunicar los riesgos para los usuarios de los productos fabricados y comercializados en la UE. La evaluación de la sensibilidad dérmica está entre los requerimientos estándar de información necesaria para sustancias fabricadas o importadas en cantidades superiores o iguales a 1 tonelada, lo que lo convierte en requisito para todos los productos químicos registrados bajo REACH. Estas sustancias deberán estar registradas para el 31 de mayo de 2018.

Se estima que se necesitará información de 20.000 productos químicos y, asumiendo que puedan agruparse en un 50%, 10.000 productos químicos deberán ser estudiados para evaluar su sensibilidad dérmica utilizando ensayos en animales, a no ser que los métodos alternativos estén disponibles en este tiempo.

La información sobre sensibilización dérmica es también requisito reflejado en las directivas sobre comercialización de Biocidas (Regulación (EU) N° 528/2012) y de Productos de Protección de Plantas (Regulación (EC) N° 1107/2009).

En cuanto a los productos cosméticos, la legislación (Directiva Cosmética (76/768/EEC) y su 7ª enmienda (Directiva 2003/15/EC) establece que deben ser evaluados todos los ingredientes independientemente de su volumen de producción. La sensibilización dérmica se encuentra entre los puntos más relevantes en la evaluación del perfil toxicológico de estos productos. La regulación de productos cosméticos es la más avanzada en el sentido de que exige no solo la identificación del peligro, sino también la caracterización del riesgo, para lo que se necesita conocer la potencia del sensibilizante.

Mecanismos moleculares en la sensibilización dérmica

La dermatitis de contacto alérgica (ACD) se caracteriza por enrojecimiento de la piel, acompañada de episodios de picor periódicos y recurrentes. Con una prevalencia del 15-20%, la ACD ha llegado a ser un gran problema de salud medioambiental y ocupacional. La ACD es una enfermedad crónica y la recomendación a los individuos afectados es evitar completamente los alérgenos por contacto.

A nivel biológico la ACD es un proceso inmunológico que se describe en dos etapas: la **inducción** de la sensibilización y la **elicitación** de la respuesta inmunológica [7]. En la fase de inducción o de adquisición, el alérgeno penetra la epidermis de la piel. Durante esta etapa los compuestos químicos están sujetos a procesos de biotransformación que pueden aumentar o disminuir el potencial alergénico. El

compuesto químico o su metabolito, forma un conjugado estable con proteínas transportadoras de la piel. Este conjugado estable (o complejo proteína-hapteno) es procesado por las células dendríticas epidérmicas (células de Langerhans) y dérmicas, con la consiguiente activación y maduración de estas células mientras migran hacia los nódulos linfáticos. Asimismo, los complejos proteína-hapteno pueden también reaccionar y activar la respuesta en los queratinocitos, que a su vez también pueden interactuar con las células dendríticas. En los nódulos linfáticos, las células dendríticas realizan el proceso de presentación antigénica a los linfocitos T, induciendo la diferenciación y proliferación de las células T alérgeno-específicas, algunas de las cuales recirculan a través del organismo (figura 1) [8].

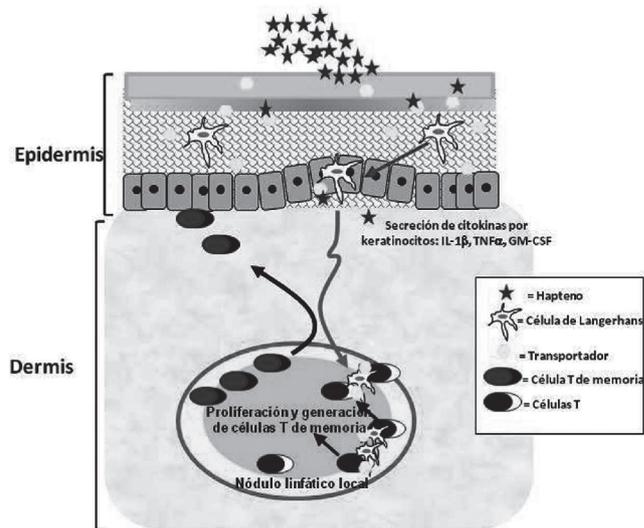


Figura 1. Fase de inducción de la sensibilización dérmica. Fuente: “The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins” (OECD) [8].

La fase de elicitación ocurre después del contacto con el mismo alérgeno. Se forma de nuevo el conjugado hapteno-proteína que posteriormente es captado por las células dendríticas epidérmicas, así como por otras células presentadoras del antígeno. Las células alérgeno-específicas circulantes secretan citoquinas específicas que inducen la liberación de citoquinas inflamatorias y la movilización de células T citotóxicas, así como otras células inflamatorias a partir de la sangre circulante. Estas células migran a la epidermis de la piel e inducen la típica respuesta inflamatoria con enrojecimiento, ampollas, y picor y quemazón de la piel (figura 2) [8].

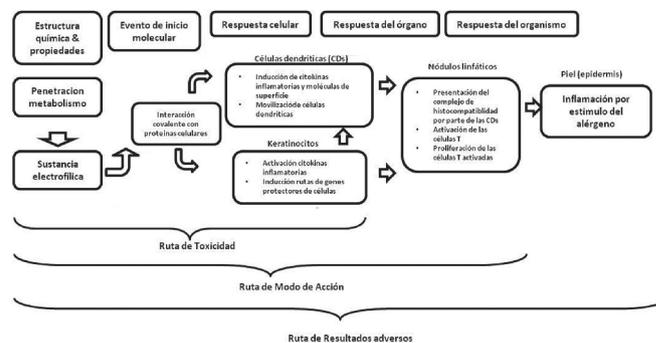


Figura 2. Fase de elicitación de la sensibilización dérmica. Fuente: “The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins” (OECD) [8].

La secuencia de mecanismos adversos (Adverse outcome pathway; AOP) es la sucesión de eventos que suceden a partir de una estructura química, pasando por los eventos moleculares iniciales hasta que sucede la reacción *in vivo*. Cada AOP representa el conocimiento que se tiene de las relaciones que existen desde el inicio de la reacción molecular hasta la reacción adversa, a nivel del individuo. El diagrama de flujo de los eventos asociados con la sensibilización dérmica está recogido en el documento publicado por la OECD (figura 3) [8,9] y reconoce 4 pasos clave desde el inicio hasta que sucede el efecto adverso. El primero es la interacción molecular con

las proteínas de la piel, y en particular la unión covalente a residuos de cisteína y/o lisina. El segundo paso tiene lugar en el queratinocito e incluye las respuestas inflamatorias así como la expresión génica asociada con vías específicas de señalización celular, tales como la ruta dependiente del elemento de respuesta antioxidante/electrófilo (antioxidant/electrophile response element; ARE/EpRE). El tercer paso es la activación de las células dendríticas, que se miden por expresión de marcadores de superficie, quimioquinas y citoquinas. Por último, el cuarto paso clave es la proliferación de las células T, que se mide de forma indirecta en el ensayo LLNA.

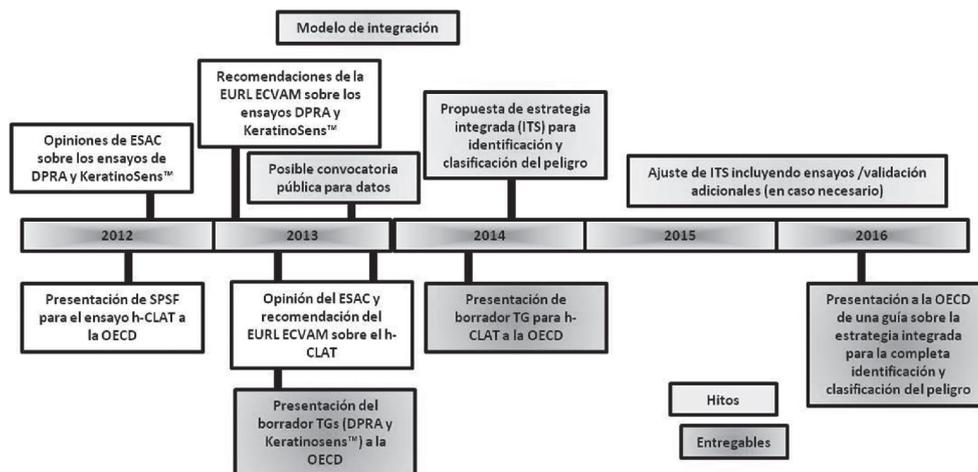


Figura 3. Diagrama de flujo de los mecanismos asociados con la sensibilización dérmica. Fuente: “The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins” (OECD) [8].

Evaluación de la sensibilización dérmica

La capacidad de un compuesto químico de inducir sensibilización se evalúa mediante métodos recogidos en la legislación, con el objeto de limitar y controlar el uso de productos sensibilizantes que pueden llegar al consumidor.

Tradicionalmente, los ensayos de sensibilización se han realizado en animales, siendo el método de maximización en cobayas el más utilizado. Dicho método fue descrito por Magnusson y Kligman en 1969 [10] y evalúa las fases de inducción y elicitación del proceso de sensibilización dérmica. Se rasura la piel del cobaya y se realiza una inyección intradérmica del producto en estudio junto con adyuvante de Freund para potenciar el efecto sensibilizante. Una semana después se realiza una aplicación tópica del producto y se mantiene durante 48 horas mediante un vendaje oclusivo. A los 21 días se vuelve a aplicar el producto y se mantiene durante 24 horas y después de retirar el apósito y el producto se valora la aparición de edema o eritema a las 48 y 72 horas. El ensayo es largo y costoso al durar más de 21 días y requerir la utilización de un gran número de animales.

El ensayo del nódulo linfático local (Local Lymph Node Assay; LLNA) en ratón se ha utilizado como alternativa al método de Magnusson, al reducir el dolor y el estrés animal, utilizando además un menor número de animales (OECD TG 429, OECD TG 442A; OECD TG 442B). Sin embargo, este ensayo únicamente puede utilizarse para clasificar un producto como negativo (no-sensibilizante) y no sirve para estudiar una posible relación dosis-respuesta.

Con la excepción del método LLNA, los modelos *in vivo* utilizados [11] para evaluar la sensibilización dérmica miden la inducción de la sensibilización mediante la monitorización clínica de las “respuestas

del organismo”, tales como la aparición de eritemas, edemas e hinchazón de las orejas. Dichas respuestas se determinan mediante la comparación de los individuos expuestos al producto a ensayar frente a otros expuestos al producto control [11]. El ensayo LLNA mide el potencial sensibilizante de un compuesto químico antigénico, en función de su capacidad inductora (evalúa la fase de inducción), en lugar de su capacidad para provocar una reacción desencadenante. Para ello, determina la capacidad de los productos químicos, aplicados por vía tópica para inducir una respuesta proliferativa en las células de los ganglios linfáticos que drenan el área donde se aplica el producto. Es por tanto, una respuesta del órgano. Según datos históricos, la utilidad de los ensayos animales para predecir la capacidad de un compuesto químico para inducir dermatitis de contacto alérgica en humanos no supera el 80% [12]. En el ensayo LLNA, el resultado se calcula mediante el valor EC3 (Concentración que provoca un índice de estimulación de 3); aquella concentración de producto que induce un aumento de 3 veces sobre los controles, en la actividad proliferativa de las células del ganglio. En algunos tipos de productos químicos, tales como surfactantes, el método LLNA muestra falsos positivos [12].

Mientras que los ensayos disponibles en animales determinan respuestas del organismo completo o de los órganos para evaluar el potencial de sensibilización de un compuesto químico, los ensayos que no utilizan animales y, por tanto, utilizan sistemas *in vitro*, son capaces de cuantificar los eventos claves descritos en el modo de acción de un sensibilizante.

El avance metodológico en el desarrollo de métodos alternativos junto con la presión social a fin de evitar la utilización de animales en experimentación para la evaluación de la seguridad de compuestos, ha llevado a la Unión Europea a imponer la prohibición de ensayos

con animales en cosméticos desde marzo de 2013. Sin embargo, no se ha tenido en cuenta la disponibilidad de métodos alternativos validados y aceptados que no utilicen animales, por lo que resulta difícil su aplicación [13].

La presión legislativa ha provocado la investigación y el desarrollo de métodos alternativos que, convenientemente validados sean capaces de predecir la sensibilización dérmica causada por compuestos químicos. En Europa se creó en 1991 EURL ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) con el objetivo de cumplir con las necesidades de la Directiva Europea para la protección de los animales de experimentación y su función es apoyar activamente el desarrollo, validación y aceptación de métodos alternativos con la finalidad de reducir, refinar y reemplazar el uso de animales de laboratorio. También es responsable de la generación de una base de datos sobre métodos alternativos y de la organización de reuniones de expertos en métodos alternativos.

El proceso de validación de nuevos métodos comprende desde el desarrollo del método en un determinado laboratorio, un ensayo previo de prevalidación en el que participan pocos laboratorios y el posterior estudio de validación en el que están implicados un número amplio de laboratorios. Con los datos recogidos se procede a la evaluación del método y la posterior aceptación por las autoridades reguladoras, siendo esta última fase del proceso la más compleja y lenta.

Para validar un ensayo se necesita demostrar la necesidad del método para suplir al método *in vivo* ya existente, disponer de indicadores del

efecto biológico que se presenta *in vivo*, un protocolo experimental bien desarrollado y que el método sea reproducible en el propio laboratorio y en otros laboratorios. Asimismo se necesitan productos de referencia que posean un efecto *in vivo* ampliamente estudiado, que el método tenga una relación con datos toxicológicos y que el procedimiento cumpla las buenas prácticas de laboratorio [14].

Avances recientes en la evaluación de la sensibilización dérmica

Recientemente, EURL ECVAM ha publicado la estrategia para la sustitución de ensayos con animales en la evaluación de la sensibilización dérmica [15]. Como consecuencia, EURL ECVAM publica su decisión de enfocar sus acciones en el área de la sensibilización dérmica durante los próximos 5 años, abordando el desarrollo de estrategias de evaluación que, sin utilizar animales, sean adecuadas para la identificación del daño y la clasificación de los compuestos sensibilizantes. Este planteamiento tiene como objetivo el desarrollo de guías de ensayo que faciliten una aproximación global a la identificación y clasificación del daño producido por la sensibilización dérmica. El mapa de ruta planteado por EURL ECVAM contempla objetivos a medio plazo (2014-2015), como mejorar los conocimientos sobre el metabolismo y la eliminación epidérmica que tienen lugar en el proceso de sensibilización; y objetivos a largo plazo (2016) con la propuesta e implementación de una estrategia definida, que incluya las guías de la OECD, para identificar el potencial sensibilizante con vistas a satisfacer los requerimientos de información de la regulación europea (figura 4) [15].

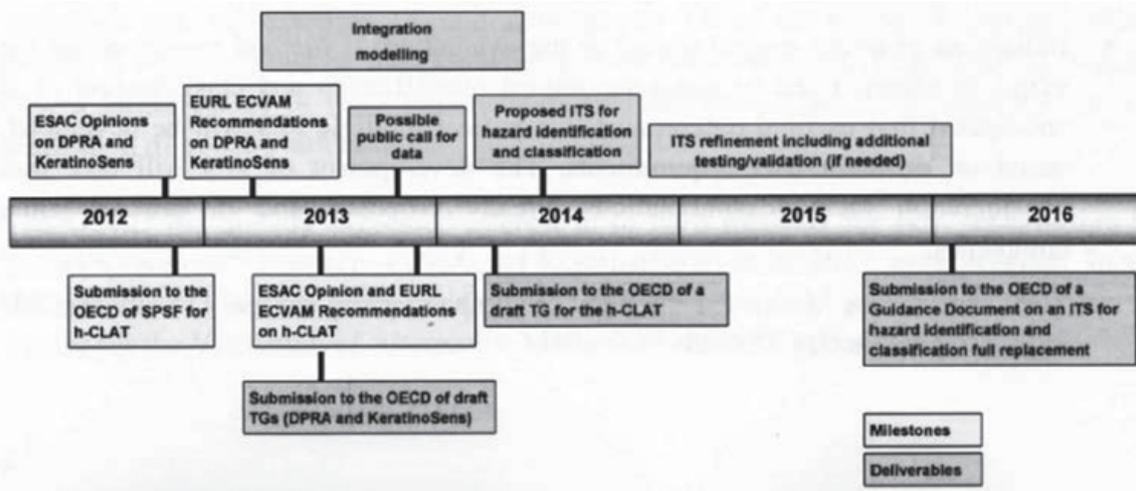


Figura 4. Mapa de ruta de EURL ECVAM para alcanzar la identificación y clasificación del daño debido a la sensibilización dérmica mediante métodos alternativos. Fuente: EURL ECVAM [15]. ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee; SPSF: Standard Project Submission Form; TG: Test Guidance; ITS: Integrated Testing Strategy.

EURL-ECVAM recomienda incorporar tres métodos *in vitro*; Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA), KeratinoSens™ y el Ensayo de Activación de la estirpe celular humana (h-CLAT) en la estrategia de evaluación de los sensibilizantes dérmicos [15].

Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA)

El ensayo DPRA fue desarrollado por Frank Gerberick en 2004 [16] y posteriormente modificado en 2007 [17]. Este ensayo evalúa el potencial sensibilizante del compuesto químico, al cuantificar la disminución de heptapéptidos sintéticos que contienen residuos de cisteína o lisina, tras 24 horas de incubación con el compuesto. La disminución de los péptidos se cuantifica en la mezcla de reacción por

HPLC (por detección UV). La disminución peptídica media para la cisteína y la lisina se interpreta a través de un modelo de clasificación desarrollado a partir de una base de datos de compuestos químicos con propiedades de reactividad conocidas, en la cual los compuestos se clasifican según el grado de reactividad. De esta manera, los valores medios de porcentaje de disminución obtenidos para la cisteína y la lisina en el ensayo se utilizan para clasificar los compuestos químicos en 4 categorías de reactividad: mínima, baja, moderada y alta reactividad. Una alta reactividad se correlaciona con un alto potencial sensibilizante.

Este ensayo se dirige a uno de los mecanismos iniciales en el proceso de sensibilización dérmica; donde se produce la unión covalente de

sustancias de bajo peso molecular (haptenos) a proteínas de la piel (haptención).

En la recomendación publicada por EURL ECVAM sobre dicho ensayo [18] se concluye que el DPRA es un ensayo relevante desde el punto de vista mecanístico y que puede contribuir a la evaluación del potencial sensibilizante de los compuestos químicos cuando se integra con otros datos o ensayos. El estudio por parte de ECVAM [18] ha mostrado que DPRA es un método transferible y reproducible. La evaluación completa del método no es objeto de EURL ECVAM puesto que no se propone como método que sustituya completamente a los realizados en animales, a pesar de que la exactitud, calculada a partir del estudio de validación, con la que se discrimina entre sensibilizantes y no sensibilizantes es del 86%. Además, la información recogida del ensayo DPRA puede tener la posibilidad de contribuir a la evaluación de la potencia (cantidad de compuesto químico antigénico por unidad de área de piel, requerida para inducir una sensibilización, o para desarrollar una respuesta desencadenante). Se necesita realizar más estudios utilizando datos de humanos para determinar cómo los resultados del DPRA pueden ser aprovechados en estrategias integradas para la predicción de la potencia de un sensibilizante dérmico. EURL ECVAM recomienda que los resultados del ensayo DPRA se combinen con datos obtenidos a través de otras fuentes de información. Esto es debido a que el DPRA cubre solo un mecanismo biológico de la ruta de sensibilización y a ciertas limitaciones del ensayo, tales como la carencia de capacidad metabólica, lo que no permite su aplicación a pre- ni pro-haptenos, ni a compuestos metálicos o a sustancias con propiedades oxidativas. Sin embargo, se están realizando esfuerzos para detectar este tipo de compuestos. Una posibilidad sería la incorporación en el ensayo de un proceso de activación oxidativa, mediado por una enzima para detectar pre- y pro-haptenos [19-21]. Asimismo, hay que tener en cuenta alguna de las limitaciones técnicas del ensayo, que incluyen la solubilidad de los compuestos en los solventes recomendados para el ensayo, problemas de co-elución del compuesto con los péptidos sintéticos y la posibilidad de la aparición de dímeros de cisteína en aquellos compuestos que puedan promover su oxidación, dificultando una correcta evaluación de los resultados.

EURL ECVAM recomienda el desarrollo de una guía de la OECD para el ensayo DPRA. Dicha guía se encuentra, actualmente, en la fase de borrador final pendiente de la revisión de los últimos comentarios públicos [22].

Ensayo KeratinoSens™

El ensayo KeratinoSens™ es un método *in vitro* diseñado para discriminar entre un compuesto químico sensibilizante dérmico y otro no-sensibilizante. El método cuantifica la inducción del gen luciferasa como una medida de la activación de la ruta dependiente de Keap1-Nrf2-elemento de respuesta antioxidante/electrófilo (ARE) en una línea celular inmortalizada derivada de keratinocitos humanos transfectados con un plásmido seleccionado. El ensayo keratinoSens™ está dirigido al mecanismo de inducción citoprotector de keratinocitos, considerado el segundo evento clave en la AOP de la sensibilización dérmica [8]. La ruta Keap1-Nrf2-ARE constituye la principal vía de regulación en la respuesta citoprotectora al estrés oxidativo, controlando la expresión de proteínas y enzimas implicadas en la detoxificación y respuesta a dicho estrés. Varios estudios *in vivo* demuestran la participación de esta vía regulatoria en la sensibilización dérmica [23,24], por lo que se considera relevante la información que aporta KeratinoSens™ para la evaluación del potencial sensibilizante de productos químicos. De

forma similar a este ensayo, se está estudiando la posibilidad de utilizar otras líneas celulares humanas transgénicas, relevantes en el proceso de sensibilización dérmica (queratinocitos, células dendríticas y otras líneas celulares) (“me-too” test methods) [25].

A principios del 2014, EURL ECVAM publicó su recomendación sobre KeratinoSens™ [26] concluyendo que el método es mecanísticamente relevante para ser utilizado en aproximaciones integradas para la evaluación de la sensibilidad. De acuerdo a los datos del estudio de validación, el método ha mostrado ser transferible de un laboratorio a otro y reproducible entre laboratorios, con una exactitud en la discriminación entre sensibilizantes y no-sensibilizantes que alcanza el 75%, lo que está en línea con los valores publicados en la literatura científica. Además, la información dosis-respuesta generada en el ensayo KeratinoSens™ juega un importante papel en la predicción de la potencia de un posible sensibilizante. De la misma forma que para el ensayo de DPRA, se necesita más información obtenida a partir de la utilización de datos obtenidos en humanos para comprender cómo la información del KeratinoSens™ puede predecir el potencial sensibilizante.

Teniendo en cuenta por una parte, que el método representa en un solo paso dentro del mecanismo molecular del proceso de sensibilización; y por otra la limitada capacidad metabólica del ensayo y la detección única de químicos reactivos a la cisteína, EURL ECVAM recomienda la utilización del método en combinación con otras informaciones. También hay que tener en cuenta alguna de las limitaciones técnicas de este ensayo, que afectan a los compuestos con baja solubilidad o estabilidad en los solventes recomendados.

También recomienda el desarrollo de la guía de la OECD, la cual al igual que en el caso del DPRA se encuentra publicada en formato borrador sometido a comentarios públicos en revisión [25].

Ensayo de Activación de la estirpe celular humana (h-CLAT)

El ensayo h-CLAT fue descrito por primera vez por Ashikaga y colaboradores [27] y se emplea para identificar alérgenos de contacto, permitiendo discriminar entre compuestos sensibilizantes y no sensibilizantes. Este ensayo utiliza la línea celular de leucemia monocítica humana (THP-1), en la que se cuantifica la sobreexpresión de los marcadores de superficie CD86 y CD54, en respuesta al tratamiento con el potencial sensibilizante, mediante citometría de flujo. Consecuentemente, el ensayo h-CLAT cuantifica estas proteínas marcadoras de superficie asociadas a la maduración de las células dendríticas *in vivo*; por lo tanto, está dirigido a uno de los mecanismos biológicos incluidos en el evento 3 del AOP de la sensibilización dérmica [8], mecanismo en el cual las células dendríticas aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86 y CD54) para realizar el proceso de presentación antigénica a los linfocitos T [28].

De acuerdo con los datos de un estudio de validación y otros estudios publicados, este método ha mostrado ser transferible de un laboratorio a otro y con una reproducibilidad del 80% entre laboratorios. Tiene una exactitud en la discriminación entre sensibilizantes (de categoría 1) y no-sensibilizantes que alcanza el 88%, con una sensibilidad del 95% y especificidad del 69% [29]. Sin embargo, hay que tener en cuenta, al igual que en los ensayos anteriores, que este método únicamente está basado en uno de los eventos que tienen lugar en el proceso de sensibilización, por lo que se recomienda su utilización en combinación con otras informaciones. Además, hay estudios para clasificar los compuestos en base a su potencia cuando se utiliza este método junto con otras estrategias integradas [30]. Sin embargo, aún se necesita más trabajo

para conseguirlo. También hay que tener en cuenta que este método sólo se puede aplicar para aquellos compuestos solubles o que formen dispersiones estables en el solvente. Los resultados negativos en este ensayo tienen que ser interpretados con precaución, debido a la baja actividad metabólica de la línea celular (los pro-haptenos y pre-haptenos pueden dar lugar a falsos negativos).

El ensayo h-CLAT ha sido evaluado en un estudio de validación coordinado por EURL ECVAM y en colaboración con el Centro Japonés para la Validación de métodos Alternativos (JaCVAM).

Recientemente, la OECD ha publicado un primer borrador del ensayo [31].

Resumiendo, estos tres son los métodos *in vitro* evaluados por EURL ECVAM más prometedores a día de hoy. Todos ellos son transferibles y reproducibles. Sin embargo, cada uno aborda un evento diferente dentro del proceso de sensibilización dérmica publicado por la OECD [8]. La Tabla 1 recoge las principales características de cada uno de ellos, con sus ventajas e inconvenientes.

Tabla 1. Resumen de los tres métodos *in vitro* principales de evaluación de la sensibilización dérmica.

Método	AOP	Ventajas	Inconvenientes	Limitaciones
Ensayo DPRA	Identifica unión a proteínas (haptención) (Evento 1)	Bajo coste en ejecución. Rapidez obtención resultados. No dependencia de una casa comercial.	No es un ensayo celular. No aporta relación dosis-respuesta.	No aplicable a compuestos metálicos, ni a compuestos con propiedades oxidativas.
KeratinoSens™	Identifica respuesta inflamatoria en la epidermis (Evento 2)	Aporta información dosis-respuesta. Es un ensayo celular.	Dependencia de una casa comercial. Alto coste en ejecución. Necesita personal entrenado en cultivos celulares.	Limitada capacidad metabólica.
Ensayo h-CLAT	Identifica activación de células dendríticas (Evento 3)	Es un ensayo celular. No dependencia de una casa comercial.	Necesita personal entrenado en cultivos celulares y citometría de flujo.	Limitada capacidad metabólica.

Otros métodos

Entre los años 2005 y 2011 EURL ECVAM participó en el proyecto Sens-it-iv (6º Programa Marco de investigación de la Unión Europea; EU FP6), cuyos resultados permitieron la revisión y validación actual de métodos alternativos para identificar alérgenos de contacto. Algunos de los estudios realizados en este campo, se describen a continuación:

Una de las vías de estudio para la identificación de alérgenos de contacto y fotoalérgenos, se ha basado en la producción de IL-18 en cultivos de queratinocitos [20,32-34]. En esta línea, también se han realizado esfuerzos enfocados al desarrollo y validación de métodos para la evaluación de un sensibilizante dérmico utilizando modelos tridimensionales. La liberación de IL-18 en equivalentes epidérmicos de piel expuestos a compuestos químicos puede ser utilizada no solo para evaluar si el producto es sensibilizante o no, sino también para predecir su potencia [35].

La producción de IL-8 en células THP-1, se ha empleado como otra vía de estudio para identificar alérgenos de contacto y fotoalérgenos [20,36]. A partir de esta línea celular transfectada con plásmidos (THP-1 G8) se ha desarrollado un método de screening para identificar sensibilizantes cutáneos, por medio de la detección de IL-8 (IL-8 Luc Assay). Este método ha demostrado ser simple, rápido y con una exactitud mayor del 80% (similar a los ensayos KeratinoSens™ y h-CLAT) y actualmente se encuentra en proceso de validación [37,38]. Asimismo, la empresa BASF y la Corporación Promega han colaborado en el desarrollo de una nueva línea celular que sienta las bases de un ensayo de reactividad de proteínas *in vitro* (el ensayo LuSens). Esta línea celular incorpora un gen luminiscente desarrollado por Promega y cuando la célula está en presencia de un sensibilizante, produce una emisión de luz que puede ser detectada por luminiscencia. La predictividad de este método se ha comparado con la del ensayo KeratinoSens™ [39]. Este ensayo ha sido

recientemente enviado a EURL ECVAM para su validación.

Otro método cuya validación finalizó en Agosto de 2012, similar al ensayo h-CLAT, es el ensayo MUSST (Myeloid U937 Skin Sensitisation Test). Este método emplea la línea celular U937 (Línea celular establecida a partir de un Linfoma Histiocítico difuso, que presenta características monocíticas). Empresas como L'Oréal [40] y Cosmital SA, Procter & Gamble [41] han desarrollado protocolos basados en esta línea celular. Este ensayo mide la sobreexpresión de la molécula co-estimuladora de superficie CD86 en las células cuando son expuestas al compuesto sensibilizante [42].

También se han desarrollado métodos genómicos para identificar sensibilizantes cutáneos. Uno de ellos, es el ensayo GARD (Genomic Allergen Rapid Detection) que mide niveles transcripcionales de determinados biomarcadores genómicos predictivos de sensibilización, para la clasificación de los compuestos químicos [43]. Neves y colaboradores [44] han desarrollado un método que cuantifica los cambios en la expresión génica y la actividad intracelular de células dendríticas expuestas a los compuestos químicos para determinar si un producto es sensibilizante o no. En este método, se cuantifican niveles de expresión de RNA mensajero, de una serie de cuatro genes y proteínas implicados en tres rutas de señalización intracelular. Para ello se emplea una línea celular derivada de células dendríticas dérmicas de ratón que se trata con el compuesto químico. Los resultados mostraron una sensibilidad del 92% y una especificidad del 100%, lo que ha llevado a sus autores a proponer el método como parte de la estrategia integrada. Asimismo, se han desarrollado métodos que se basan en el reconocimiento de los compuestos químicos por parte de los linfocitos T [45]. Una forma es mediante el cultivo de linfocitos T vírgenes o naive (linfocitos que nunca han estado en contacto con el antígeno) con células dendríticas derivadas de monocitos, tratadas con el compuesto químico y re-estimuladas posteriormente (ensayo hTCPA; human T-cell priming assay). Se mide el porcentaje de linfocitos T-antígeno específicos y la

producción de las citoquinas IFN- γ and TNF- α [46]. También se han desarrollado métodos basados en la migración de las células dendríticas, emulando el proceso en el que las células de Langherhans migran a los ganglios linfáticos durante el proceso de sensibilización dérmica (ensayo de migración MUTZ-LC). Para ello, se emplean líneas celulares diferenciadas que se asemejan a las células de langherhans (MUTZ-LC), se marcan con un compuesto fluorescente (carboxyfluorescein succinimidyl ester; CFSE) y se siembran en insertos transwell, permitiéndolas migrar a la cámara basolateral tras el contacto con el compuesto sensibilizante y en presencia de una serie de quimiocinas. Posteriormente se cuantifica la intensidad de fluorescencia en la cámara basolateral. Este ensayo es muy sensible considerando que estas células tienen una elevada actividad metabólica, pero es un sistema complejo y requiere personal con experiencia para realizarlo [35,47,48] Este tipo de ensayos también se han realizado empleando modelos de piel humana reconstituida o modelos 3D [49,50].

Otro ensayo que utiliza un modelo de piel humana reconstituida es el método SenCeeTox, donde se emplea el modelo EpiDerm (modelo aprobado por la OECD para la evaluación de la irritación y corrosión dérmica). Mediante la combinación del proceso de reactividad peptídica con la medida de marcadores celulares en este modelo, el compuesto sensibilizante se puede clasificar según el daño y la potencia. Este ensayo está siendo evaluado antes de ser enviado a EURL ECVAM [51-53].

Los métodos *in silico* también están siendo evaluados para el desarrollo de estrategias de ensayo integradas. Entre otros, se ha desarrollado una herramienta informática, que calcula la permeación y concentración de compuestos aplicados tópicamente sobre la piel. Se trata de un modelo dimensional que simula el proceso de liberación en el ensayo LLNA y predice la concentración de compuesto químico en la epidermis [20]. Asimismo, pueden utilizarse como ensayos complementarios para aquellos compuestos en los que su clasificación es dudosa, donde el empleo de un modelo predictivo de actividad de la molécula con su estructura química (Sistemas QSAR; Quantitative structure activity relationships) puede servir de gran utilidad [51]. Estos sistemas QSAR intentan identificar alérgenos de contacto, basándose en los datos fisicoquímicos y los parámetros de reactividad de los grupos funcionales de las moléculas químicas.

Todos los trabajos aquí mencionados, junto con numerosos estudios adicionales que se han realizado en los últimos años, han permitido generar un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso de sensibilización dérmica y nos permiten avanzar en el establecimiento de las estrategias de ensayo integradas combinando diferentes métodos *in vitro*.

Perspectivas de futuro: estrategias de integración

La investigación realizada apunta a la conclusión de que la sustitución de los ensayos en animales para la evaluación de la sensibilidad dérmica no va a ser posible mediante la ejecución de un solo ensayo; sino que tendrá que ser una combinación de varios métodos alternativos que evalúen los diferentes eventos clave que suceden en la ruta de la sensibilización dérmica. Por lo tanto, se necesitan esfuerzos económicos y humanos para el desarrollo de estrategias integradas basadas en métodos *in silico*, químicos e *in vitro*, que sean capaces de predecir el potencial sensibilizante de un producto y su potencia. La literatura ofrece algunas propuestas iniciales utilizando datos de los tests validados, que van desde simples estrategias secuenciales [54,30] y soluciones estadísticas

[55,56] a redes Bayesianas [57] y redes neuronales artificiales de análisis de datos a partir de múltiples ensayos *in vitro* [58]. Asimismo está siendo explorado el uso de modelos matemáticos para cuantificar la relación entre la dosis de sensibilizante aplicado en la piel y el grado de respuesta de las células T-específicas del hapteno que tiene lugar en humanos [59].

EURL ECVAM también participa en el desarrollo de estas estrategias integradas basadas en técnicas no animales y con la capacidad no solo de distinguir entre productos sensibilizantes y no sensibilizantes sino también de subdividir entre productos 1A: Sensibilizantes fuertes y 1B: otros sensibilizantes dérmicos (Sistema de clasificación y etiquetado basado en el Sistema Global Harmonizado (GHS) [60]. Para ello, colabora con ECHA (European Chemical Agency) en asegurar que las estrategias que sean desarrolladas cumplan los requisitos de información requeridos por la legislación REACH.

De forma complementaria, se está desarrollando un proyecto financiado por “Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force” que consiste en un programa de varias fases en el que se evalúa la contribución de los métodos en las estrategias integradas, con el objetivo de desarrollar procesos de decisión basados en ensayos que no utilicen animales y capaces de predecir la potencia de los sensibilizantes. El “US National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)” en coordinación con el US National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), está evaluando ensayos de screening para un gran número de moléculas para la evaluación de la sensibilización dérmica, en el marco de las actividades Tox21s.

Por otra parte, el ICCVAM (the US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) ha publicado recientemente su intención de comenzar actividades dirigidas al diseño de estrategias de decisión integradas basadas en la utilización de datos de los métodos validados por EURL ECVAM (DPRA, KeratinoSensTM y h-CLAT) y predicciones *in silico*.

En vista de las investigaciones realizadas, parece lógico pensar que los distintos objetivos de las diversas legislaciones con relación a la sensibilización dérmica (identificación del daño y/o predicción de la potencia) serán cubiertos por distintas estrategias integradas. Y en este punto, EURL ECVAM está trabajando en el desarrollo de un marco general para la sensibilización dérmica, adecuado para todos los productos químicos y legislaciones, que esté descrito para ayudar a identificar las fortalezas y debilidades de cada estrategia con el fin de facilitar las predicciones.

El punto de vista desde una Organización de Investigación por Contrato (CRO)

El concepto CRO (Organización de Investigación por Contrato) define una organización que ofrece a la industria farmacéutica, biotecnológica y médica servicios de investigación que realiza en base a un contrato acordado por ambas partes. Los servicios que realiza pueden enmarcarse en el desarrollo biotecnológico, desarrollo de ensayos biológicos, comercialización, investigación preclínica, investigación clínica, organización de ensayos clínicos o la farmacovigilancia. Muchos de estos proyectos tienen como objetivo la presentación y correspondiente aceptación en una agencia regulatoria. Además, este objetivo le obliga a trabajar de acuerdo a los principios de calidad establecidos por las entidades de acreditación (BPL, BPF) y a someterse a las correspondientes inspecciones para acreditar la validez de sus procesos. Esta posición que ocupa como “intermediario” le permite, por una parte, conocer la problemática a la que se enfrentan tanto las grandes como las pequeñas empresas del

sector farmacéutico y cosmético; y, por otra, dinamizar el sector mediante la generación de nuevos servicios que beneficien la actividad industrial en estos sectores.

El Centro Tecnológico GAIKER ha desarrollado su actividad, durante 15 años, como CRO realizando proyectos para la industria, que están relacionados con la evaluación toxicológica y farmacocinética *in vitro* de productos farmacéuticos y cosméticos.

La sustitución parcial o total de los métodos que emplean animales ha sido una constante en los últimos años. La investigación ha hecho posible que existan métodos alternativos validados capaces de predecir algunos de los efectos no deseados sobre la salud humana de productos químicos, cosméticos, etc...

Sin embargo, todavía es necesario un acercamiento entre la ciencia, la política, la legislación y la educación para que el conocimiento pueda ser transferido. Tanto para el caso de la sensibilización dérmica como para el de otros efectos que necesitan ser evaluados mediante métodos alternativos, las empresas tienen que convencerse de que utilizándolos salen ganando porque mejoran la predicción de los efectos no deseados, son menos costosos y también son más rápidos en la obtención de resultados. En el centro de la cuestión, la legislación y el mundo científico deben ir de la mano para que la colaboración favorezca el diseño de métodos validados que puedan ser ampliamente utilizados, las empresas no utilizarán métodos que no sean recogidos por la legislación en el momento del registro. Legisladores y científicos deben tener en cuenta que las empresas necesitan que los métodos sean validados en tiempos razonablemente cortos para poder poner en el mercado sus productos cumpliendo con la legislación. En este terreno, las CRO aportan a las empresas la información sobre el estado actual de validación de los métodos alternativos, ejerciendo tareas de asesoría y formación, muy necesarias para que las empresas los incorporen en sus estrategias de evaluación y se beneficien de las oportunidades de utilizar métodos *in vitro* validados en la predicción del riesgo para la salud. Las CRO juegan, por tanto, un importante papel en el desarrollo y validación de los métodos actuando como motores de la utilización de métodos alternativos en la evaluación del riesgo para la salud.

En la actualidad, un gran número de empresas ya han incorporado en sus rutinas la evaluación de efectos no deseados como la irritación dérmica mediante sistemas *in vitro*, pero la evaluación de la sensibilización dérmica mediante métodos que no utilicen animales está todavía poco extendida y es necesario que la legislación tome decisiones concluyentes en cuanto a la estrategia de evaluación de un posible sensibilizante dérmico para que no solo las grandes, sino también las pequeñas empresas puedan incorporarlos a sus procesos de evaluación.

En cuanto a la investigación realizada, las grandes empresas han apostado por participar en proyectos de validación de métodos alternativos con el objetivo de poder comercializar un producto patentado (línea celular, etc...) que les permita obtener beneficios comerciales. Los métodos que se validen para formar parte de una estrategia integrada de evaluación de la sensibilización dérmica deberían no estar sujetos a procesos de patentes que impliquen un alto coste en la evaluación de los productos para las empresas de tamaño reducido, facilitando así su ejecución.

Por último, la cercanía de los plazos en cuanto a la prohibición de la utilización de ensayos en animales por parte de la Directiva Cosmética y la necesidad de información regulada por REACH parece apuntar a una disminución en la innovación de nuevos productos cosméticos; sin embargo, la situación actual también

puede ser una oportunidad para la innovación en el sector de los métodos alternativos, como lo demuestra la amplia literatura publicada en este tema.

Bibliografía

1. Ross MH, Wojciech P (2011) Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology. ISBN-13: 978-0781772006. Ed: WoltersKluwer Lipcott Williams & Wilkins.
2. Observatorio de enfermedades profesionales (CEPROSS) y de enfermedades causadas o agravadas por el trabajo (PANOTRATS). Informe anual 2013. Secretaria de estado de la Seguridad Social-Dirección General de Ordenación de la Seguridad Social.
3. Durocher LP (...). Enfermedades de la piel. En: Enciclopedia de Seguridad y salud en el trabajo. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Cap. 12.
4. Mortz CG, Lauritsen JM, Bindslev-Jensen C, Andersen KE (2001) Prevalence of atopic dermatitis, asthma, allergic rhinitis and hand and contact dermatitis in adolescents. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and dermatitis. *Br J Dermatol* 144(3): 523-532.
5. United Nations Economic Commission (UNECE) (2013) Global Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). 5th Revised Edition.
6. Grupo de Trabajo del INSHT (2012) En: Límites de exposición para agentes químicos en España. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Cap.6.
7. Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Dearman RJ (2002) Allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol* 2: 201-211.
8. The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins". Part 1: scientific evidence. OECD series on testing and assessment n° 168. Paris, 2012. ENV/JM/MONO(2012)10/PART1.
9. The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins". Part 2: use of the AOP to develop chemical categories and integrated assessment and testing approaches. OECD series on testing and assessment n° 168. Paris, 2012. ENV/JM/MONO(2012)10/PART2.
10. Magnusson B, Kligman AM (1969) The identification of contact allergen by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol* 52: 268-276.
11. OECD (1992) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 406: Skin sensitization. Paris, France. Organisation for Economic Cooperation and Development.
12. Roggen EL (2014) *In vitro* approaches for detection of chemical sensitization. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, Jul; 115: 32-40.
13. European Parliament, Council of the European Union: REGULATION (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Official J European Union* 2009, L342: 59-209.
14. Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, Lewis D (2002) Good Cell Culture Practices. *ATLA* 30: 407-414.

15. Casati S, Worth A, Amcoff P & Whelan M (2013) EURL ECVAM Strategy for Replacement of Animal Testing for Skin Sensitisation Hazard Identification & Classification. European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer.
16. Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP (2004) Development of a Peptide Reactivity Assay for Screening Contact Allergens. *Toxicol Sci* 81: 332-343.
17. Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP (2007) Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicol Sci* 97: 417-427.
18. EURL ECVAM (2013) EURL ECVAM Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitization Testing.
19. Gerberick GF, Troutman JA, Foertsch LM, Vassallo JD, Quijano M, Dobson RL, Goebel C, Lepoittevin JP (2009) Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol Sci* 112, 164-174.
20. Rovida C, Martin SF, Vivier M, Weltzien HU, Roggen E (2013) Advanced tests for skin and respiratory sensitization assessment. *ALTEX* 30: 231-52.
21. Maxwell G, Aeby P, Ashikaga T, Bessou-Touya S, Diembeck W, Gerberick F, Kern P, Marrec-Fairley M, Ovigne JM, Sakaguchi H, Schroeder K, Tailhardat M, Teissier S, Winkler P (2011) Skin sensitization: the Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment. *ALTEX* 28: 50-5.
22. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Test Guideline: *In Chemico* Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). May, 2014.
23. Kim HJ, Barajas B, Wang M y Nel AE (2008) Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of T(H)1 immunity: role of dendritic cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121: 1255-1261.
24. Van der Veen JW, Gremmer ER, Vermeulen JP, van Lobveren H, Ezendam J (2013) Induction of skin sensitization is augmented in Nrf2-deficient mice. *Archives of Toxicology* 87: 763-766.
25. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Test Guideline: *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. May, 2014.
26. EURL ECVAM (2014) EURL ECVAM Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing.
27. Ashikaga T, Hoya M, Itagaki H, Katsumura Y, Aiba S (2002) Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol In Vitro* 16: 711-6.
28. Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol.* 27: 3031-8.
29. EC EURL ECVAM (2012) Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report 10.
30. Nukada Y, Miyazawa M, Kazutoshi S, Sakaguchi H, Nishiyama N (2013) Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicol In Vitro* 27: 609-618.
31. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Test Guideline: *In Vitro* Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT). July, 2014.
32. Corsini E, Galbiati V, Mitjans M, Galli CL, Marinovich M (2013) NCTC 2544 and IL-18 production: a tool for the identification of contact allergens. *Toxicol In Vitro.* 27: 1127-34.
33. Teunis M, Corsini E, Smits M, Madsen CB, Eltze T, Ezendam J, Galbiati V, Gremmer E, Krul C, Landin A, Landsiedel R, Pieters R, Rasmussen TF, Reinders J, Roggen E, Spiekstra S, Gibbs S (2013) Transfer of a two-tiered keratinocyte assay: IL-18 production by NCTC2544 to determine the skin sensitizing capacity and epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. *Toxicol In Vitro.* (3): 1135-50.
34. Galbiati V, Bianchi S, Martínez V, Mitjans M, Corsini (2014) NCTC 2544 and IL-18 production: a tool for the *in vitro* identification of photoallergens. *Toxicol In Vitro.* 28 (1): 13-7.
35. Gibbs S, Corsini E, Spiekstra SW, Galbiati V, Fuchs HW, Degeorge G, Troese M, Hayden P, Deng W, Roggen E (2013) An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol Oct 15;272(2):* 529-541.
36. Mitjans M, Galbiati V, Lucchi L, Viviani B, Marinovich M, Galli CL, Corsini E (2010) Use of IL-8 release and p38 MAPK activation in THP-1 cells to identify allergens and to assess their potency *in vitro* *Toxicol In Vitro* 24(6): 1803-9.
37. Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, Aiba S (2011) An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci.* 124: 359-69.
38. ICATM Alternative Test Method Validation and Regulatory Acceptance, January 2014 Status Report for ICCR. JRC Technical reports.
39. Ramirez T, Mehling A, Kolle SN, Wruck CJ, Teubner W, Eltze T, Aumann A, Urbisch D, van Ravenzwaay B, Landsiedel R (2014) LuSens: A keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro* 28(8): 1482-97.
40. Ade N, Martinozzi-Teissier S, Pallardy M, Rousset F (2006) Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *J Immunotoxicol* 3: 189-97.
41. Python F, Goebel C, Aeby P (2007) Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15;220: 113-24.
42. Maxwell G, Aeby P, Ashikaga T, Bessou-Touya S, Diembeck W, Gerberick F, Kern P, Marrec-Fairley M, Ovigne JM, Sakaguchi H, Schroeder K, Tailhardat M, Teissier S, Winkler P (2011) Skin sensitisation: the Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment. *ALTEX*; 28: 50-5.
43. Forreryd A, Johansson H, Albrekt AS, Lindstedt M (2014) Evaluation of high throughput gene expression platforms using a genomic biomarker signature for prediction of skin sensitization. *BMC Genomics,* 15: 379-396.
44. Neves BM, Rosa SC, Martins JD, Silva A, Gonçalo M, Lopes MC, Cruz MT (2013) Development of an *in vitro* dendritic cell-based test for skin sensitizer identification. *Chem Res Toxicol* 18; 26: 368-378.

45. Martin SF, Esser PR, Schmucker S, Dietz L, Naisbitt DJ, Park BK, Vocanson M, Nicolas JF, Keller M, Pichler WJ, Peiser M, Luch A, Wanner R, Maggi E, Cavani A, Rustemeyer T, Richter A, Thierse HJ, Sallusto F (2010) T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of *in vitro* assays. *Cell Mol Life Sci* 67: 4171-84.
46. Richter A, Schmucker SS, Esser PR, Traska V, Weber V, Dietz L, Thierse HJ, Pennino D, Cavani A, Martin SF (2013) Human T cell priming assay (hTCPA) for the identification of contact allergens based on naive T cells and DC--IFN- γ and TNF- α readout. *Toxicol In Vitro* 27: 1180-5.
47. Ouwehand K, Spiekstra SW, Reinders J, Scheper RJ, de Gruijl TD, Gibbs S (2010) Comparison of a novel CXCL12/CCL5 dependent migration assay with CXCL8 secretion and CD86 expression for distinguishing sensitizers from non-sensitizers using MUTZ-3 Langerhans cells. *Toxicol In Vitro* 24: 578-85.
48. Gibbs S, Spiekstra S, Corsini E, McLeod J, Reinders J (2013) Dendritic cell migration assay: a potential prediction model for identification of contact allergens. *Toxicol In Vitro* 27: 1170-9.
49. Ouwehand K, Spiekstra SW, Waaijman T, Breetveld M, Scheper RJ, de Gruijl TD, Gibbs S (2012) CCL5 and CCL20 mediate immigration of Langerhans cells into the epidermis of full thickness human skin equivalents. *Eur J Cell Biol*. 91: 765-73.
50. Chau DY, Johnson C, MacNeil S, Haycock JW, Ghaemmaghami AM (2013) The development of a 3D immunocompetent model of human skin. *Biofabrication* 5: 035011.
51. Marilyn Matevia (2014) In 2014, are we closer than ever to a replacement for animal-based skin sensitization tests?, Humane Society of the United States Published: Alttox.org. April 17, 2014.
52. McKim JM Jr, Keller DJ, Gorski JR (2012) An *in vitro* method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. *Cutan Ocul Toxicol* 31: 292-305.
53. CeeTox Validation Trials, Funded by PETA, Show Method May Soon Replace Animals in Chemical Testing. <http://peta.org.uk>. (16/10/2014).
54. Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, Ezendam J (2014) Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69: 371-379.
55. Natsch A, Emter R, Ellis G (2009) Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol Sci* 107: 106-121.
56. Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R (2012) Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol*. 63(3):489-504. Erratum in: *Regul Toxicol Pharmacol*. 64: 285.
57. Jaworska J, Dancik Y, Kern P, Gerberick F, Natsch A (2013) Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol* 33: 1353-1364.
58. Tsujita-Inoue K1, Hirota M2, Ashikaga T1, Atobe T1, Kouzuki H1, Aiba S (2014) Skin sensitization risk assessment model using artificial neural network analysis of data from multiple *in vitro* assays. *Toxicol In Vitro* 28: 626-39.
59. Maxwell G1, MacKay C, Cubberley R, Davies M, Gellatly N, Glavin S, Gouin T, Jacquilleot S, Moore C, Pendlington R, Saib O, Sheffield D, Stark R, Summerfield V (2013) Applying the skin sensitisation adverse outcome pathway (AOP) to quantitative risk assessment. *Toxicol In Vitro*. 2014 28: 8-12.
60. UN (2011) Globally harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Part 3. Health and Environment Hazards. New York, USA, and Geneva, Switzerland. United Nations Economic Commission for Europe.

Los métodos alternativos en el estudio de la seguridad de cosméticos

de Lapuente J*¹, Borrás M¹, González-Linares J¹, Llanas H², Mitjans M², Ramos-López D¹ y Vinardell P².

¹Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia (UTOX-CERETOX); Parc Científic de Barcelona; c/ Baldiri Reixac 10-12; 08028 Barcelona. ²Departament de Fisiologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona.

Recibido 19 de octubre de 2014 / Aceptado 6 de noviembre de 2014

Resumen: El Reglamento 1223/2009 establece las normas que deben cumplir todos los productos cosméticos comercializados en Europa, con objeto de velar por el funcionamiento del mercado interior y lograr un elevado nivel de protección de la salud humana garantizando el uso de métodos alternativos que no impliquen la utilización de animales. El Laboratorio Europeo de Referencia para las Alternativas a la Experimentación con Animales (EURL-EURL-ECVAM) es el laboratorio de referencia en Europa encargado de validar los métodos alternativos. Posteriormente pueden ser homologados por la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE). Por otro lado, el Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (SCCS) asesora a la Comisión sobre todos los temas relacionados con la seguridad de los cosméticos. En esta revisión se detalla una relación de métodos alternativos necesarios para evaluar la seguridad de los ingredientes cosméticos así como los métodos usados y sus limitaciones.

Palabras Claves: métodos alternativos, *in vitro*, evaluación de la seguridad, cosméticos, Reglamento 1223/2009/UE

Abstract: Alternative methods in the study of the safety of cosmetics. Regulation 1223/2009 apply to all cosmetic products marketed in Europe in order to ensure the internal market and achieve a high level of protection of human health by ensuring the use of alternative methods not involving the use of animals. The European Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-EURL-ECVAM) is the European reference laboratory responsible for validating alternative methods. They can also be approved by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). In addition, the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) advises the EU Commission on all issues related to cosmetic safety. In this review, alternative methods needed to assess the safety of cosmetic ingredients and the methods used and their limitations are outlined.

Keywords: alternative methods, *in vitro*, safety assessment, cosmetics, Regulation (EC) 1223/2009

Antecedentes

Según el Reglamento europeo de Cosméticos, Reglamento 1223/2009, se define como producto cosmético a toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los

olores corporales.

Dicho Reglamento, así mismo establece que los productos cosméticos deben ser seguros en las condiciones de utilización normal o razonablemente previsibles. En especial, un razonamiento basado en el balance entre riesgos y beneficios no debe servir como justificación de un riesgo para la salud humana. El Reglamento establece las normas que deben cumplir todos los productos cosméticos comercializados, con objeto de velar por el funcionamiento del mercado interior y lograr un elevado nivel de protección de la salud humana.

En este reglamento se establece que la Comisión Europea es responsable de actualizar los anexos del reglamento en los que aparecen recopilados todos aquellos productos que están prohibidos (anexo II), y los productos que tienen un especial riesgo como son aquellos que están permitidos pero con ciertas restricciones (anexo III), los colorantes (anexo IV), los conservantes (anexo V) y los filtros solares (anexo VI).

También se establecen las competencias de los fabricantes al tener que garantizar que los productos puestos en el mercado son seguros, resaltando que la seguridad de los productos cosméticos, en Europa, se basa en la evaluación de la seguridad de cada uno de los ingredientes que constituyen el cosmético.

Existe un Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (SCCS, *Scientific Committee on Consumer Safety*) que asesora a la Comisión sobre todos los temas relacionados con la seguridad de los cosméticos y evalúa aquellos ingredientes que aparecen en los anexos.

Para proporcionar los datos sobre seguridad de los ingredientes de una forma eficaz y para ayudar a la industria a realizar dichos ensayos de toxicidad, el SCCS edita unas *Notes of Guidance* que se van actualizando periódicamente y que se publican en la página web del Comité. La última versión de dichas notas es la octava que se publicó en 2012 [1].

En dicha notas se indican los ensayos toxicológicos que se deben realizar para garantizar la seguridad de los ingredientes cosméticos.

En general la evaluación de la seguridad de los ingredientes cosméticos, que requiere el SCCS se basa en los principios de evaluación del riesgo [2,3].

Prohibición del uso de animales en los ensayos de seguridad de cosméticos

La Comisión estableció el pasado 11 de marzo de 2009 como fecha límite para la prohibición de comercializar productos cosméticos cuya formulación final, ingredientes o combinaciones de ingredientes hayan sido experimentados en animales, y en relación

* e-mail: jlapuente@pcb.ub.cat

con la prohibición de cada ensayo efectuado actualmente usando animales [4].

No obstante, para los experimentos en materia de toxicidad por administración repetida, toxicidad para la función reproductora y toxicocinética, el plazo límite se fijó el 11 de marzo de 2013.

Consciente del trabajo y las prioridades en este campo, la Comisión Europea y las autoridades competentes en este campo están haciendo un esfuerzo para validar científicamente métodos alternativos para poder llevar a cabo evaluación de la seguridad rigurosas.

Ensayos toxicológicos

La normativa Europea actual establece que es posible garantizar la inocuidad de los productos cosméticos acabados sobre la base de los conocimientos relativos a la seguridad de los ingredientes que contienen.

Es posible garantizar la seguridad de los ingredientes empleados en los productos cosméticos haciendo uso de métodos alternativos que no impliquen la utilización de animales y que estén validados a nivel comunitario por el Laboratorio Europeo de Referencia para las Alternativas a la Experimentación con Animales (EURL-EURL-ECVAM) u homologados como científicamente válidos por este organismo, con la consideración debida al desarrollo de la validación en la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE).

Dichos estudios aportan información sobre la irritación y la corrosión a nivel dérmico y ocular, sensibilización dérmica, absorción dérmica, mutagenicidad y genotoxicidad entre otros. Los estudios de toxicidad repetida aportan información de la toxicidad de los productos tras aplicación repetida y aportan el valor de NOAEL que sirve para determinar el *Margen de Seguridad* de los ingredientes (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de ensayos toxicológicos necesarios para evaluar la seguridad de ingredientes cosméticos

Condiciones	Estudios de toxicología
Estudios Básicos	Toxicidad aguda
	Irritación y corrosión
	Sensibilización dérmica
	Absorción dérmica
	Toxicidad repetida
Absorción dérmica elevada	Mutagenicidad / genotoxicidad
	Carcinogenicidad
	Toxicidad de la reproducción
Ingredientes afectados por la luz	Toxicocinética
	Fototoxicidad

En aquellos casos que el producto presente una elevada absorción dérmica se solicita información de carcinogenicidad, toxicidad de la reproducción y toxicocinética. Por otro lado, cuando los productos pueden ser afectados por la luz ultravioleta induciendo cambios que pueden afectar a su toxicidad se requieren estudios de fototoxicidad.

La mayoría de ensayos realizados tradicionalmente con animales, si bien la prohibición del uso de animales obliga a que dichos estudios se realicen, a partir de julio de 2013, *in vitro*.

En 2010, la Comisión Europea, publicó una extensa revisión de los métodos alternativos existentes, pese a que en algunos puntos ha quedado algo obsoleta, ya que en estos últimos años se han realizado varios avances en la validación y aceptación de nuevo métodos *in vitro*.

En febrero de 2013, el Laboratorio Europeo de Referencia para las Alternativas a la Experimentación con Animales (EURL-ECVAM) y entidad Cooperación Internacional sobre regulación en Cosméticos (ICCR) redactaron un documento sobre el estado de aceptación de las técnicas como métodos alternativos propuestas los métodos alternativos

El EURL-EURL-ECVAM apoya el proceso de aceptación reglamentaria posterior a la validación, tanto en la Unión Europea como en la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) [5]. La cooperación internacional en el desarrollo de métodos alternativos de ensayo para los cosméticos tiene lugar bajo ICATM - el Marco para la Cooperación Internacional sobre métodos de ensayo alternativos.

A continuación, analizaremos los ensayos tradicionales con animales y las alternativas actuales propuestas para suplir estos animales.

1.1. Toxicidad aguda

Los ensayos de toxicidad aguda describen los efectos adversos para la salud después de una única aplicación del producto según la vía de administración; oral, dérmica o inhalatoria. Durante muchos años se llevó a cabo un ensayo que permitía la determinación de la dosis que provoca la muerte de la mitad de los animales expuestos (DL_{50}) descrito en las guías de trabajo de la OECD (OECD 401).

Debido al excesivo número de animales que se utilizaban, este ensayo se substituyo por otros tres procedimientos que utilizan menos animales, con la idea de aplicar la R de Reducción dentro del concepto de 3Rs. Estos métodos son: el ensayo de la dosis fija (OECD 420), el ensayo clásico de clase toxicidad aguda (OECD 423) que permite calcular un valor aproximado de dosis letal y el método *up & down* (OECD 425) que así mismo permite una estimación del valor de DL_{50} .

Cuando la administración es por vía inhalatoria la guía de la OECD 436 (*Toxicidad aguda inhalatoria*) establece la administración inhalada de la sustancia por etapas usando 3 animales de cada sexo simultáneamente. Dependiendo de los resultados se tomará la decisión de aumentar/disminuir dosis o determinar el uso de uno o 2 sexos de los animales. La guía de la OECD 433 (Inhalación aguda por dosis fija) establece una única dosis de aplicación no letal dependiendo si hay signos de toxicidad o mortalidad.

La determinación de toxicidad aguda por piel según la guía de la OECD 434 era una de los ensayos más empleados para evaluar cosméticos, pero con la actual normativa queda totalmente prohibido su uso.

A fecha de hoy no existe un estudio *in vitro* alternativo para sustituir la toxicidad aguda.

Sin embargo la EURL-ECVAM está trabajando para buscar alternativas a estos estudios. Actualmente el proyecto EU FP6 *ACuteTox project Optimisation and pre-validation of an in vitro test strategy for predicting human acute toxicity* (EU contract no.LSHB-CT-2004-512051) busca integrar en una única herramienta datos *in vitro* e *in silico* sobre cinéticas, metabolismo y toxicidad de los órganos para predecir la toxicidad aguda oral en humanos y clasificarlos las sustancias en CLP y GHS Toxicity.

Por otro lado, en el monográfico resultante de la reunión del comité del grupo de químicos, pesticidas y biotecnología de la OECD, se establecen las bases para el uso de la citotoxicidad como método para estimar las dosis iniciales para los ensayos de toxicidad oral aguda [6].

1.2. Irritación/corrosión

Los ensayos de irritación/corrosión se realizan a nivel de la piel y también de los ojos. En el caso de la corrosión dérmica y/o ocular se refiere a las lesiones irreversibles que se producen a dicho nivel y la irritación se refiere a las lesiones reversibles. El método tradicional para el estudio de la irritación ocular y dérmica ha sido el método conocido tradicionalmente como método de Draize que data de los años 40 (Draize y col. 1944). En este ensayo se administra el producto en estudio en el ojo de conejos albinos y se observan las lesiones provocadas a nivel de córnea, iris y conjuntiva después de un tiempo de contacto del producto con el ojo. Se da una valoración numérica según el grado de lesión en córnea, iris y conjuntiva. La lesión de la córnea es la que se considera más grave comparada con la conjuntiva.

De manera similar en el caso del ensayo de irritación dérmica se aplica el producto en la piel de conejos previamente rasurados y se da una valoración numérica según el grado de lesión que se diferencia entre eritema o enrojecimiento de la piel y la aparición de edema.

Ambos procedimientos han sido ampliamente criticados por tratarse de métodos muy subjetivos en los que la puntuación otorgada depende de la experiencia del experimentador, además de considerarse las diferencias existentes entre el ojo y la piel del conejo y del humano [7]. De hecho, ambos métodos han sido el principal baluarte utilizado por los grupos antiviviseccionistas en contra de la experimentación animal para evaluar cosméticos (Figura 1).

El método original de Draize [8] ha tenido diferentes adaptaciones a lo largo de los años, incluso a nivel del protocolo de la OECD, se han tenido consideraciones de reducción y refinamiento. En estos casos se considera previamente el pH de los productos y si este es inferior a 2 o superior a 11.5, no es necesario realizar el ensayo y el producto ya se clasifica como corrosivo.

Se han desarrollado numerosos métodos para suplir los animales en los ensayos de irritación ocular y dérmica [9]. Si bien, los métodos validados y aceptados son pocos en comparación con los métodos propuestos.

1.2.1. Alternativas a los ensayos de irritación/corrosión ocular

Entre los ensayos propuestos para sustituir al ensayo de irritación ocular podemos destacar aquellos que han sido aceptados por la OECD y aparecen en sus protocolos.

Como alternativas al ensayo de irritación/corrosión ocular podemos mencionar:

- Ensayo de Opacidad corneal en córnea aislada bovina (BCOP de las siglas en inglés de Bovine Cornea Opacity Permeability). Este método aparece en los protocolos de la OECD 437 y se aceptó en 2009, si bien el protocolo ha sido reemplazado recientemente. Se basa en la aplicación de los productos sobre córneas bovinas aisladas y se mide la opacidad de dicha córnea tras el contacto con el producto en estudio

- Ensayo del ojo aislado de pollo (ICE de las siglas en inglés de *Isolated Chicken Eye*) (OECD 438). Dicho protocolo también se aceptó en 2009 y se ha modificado en 2013. Se mide la opacidad inducida en la córnea, así como el engrosamiento de la misma.

- Método de pérdida de fluoresceína para identificar corrosivos e irritantes severos. (OECD 460). Es un método *in vitro* que sirve para identificar productos solubles en agua que sean corrosivos o irritantes severos. Se utiliza un cultivo en monocapa de células MDCK que separan dos cámaras y se utiliza la fluoresceína como marcador. Aquellos productos irritantes desestabilizan la capa de células y la

fluoresceína pasa al otro lado de la cámara.



Figura 1. Ejemplo clásico de propaganda en contra de la experimentación animal

Estos métodos tienen en común que sirven solo para diferenciar los productos severamente irritantes de los no irritantes, pero no discrimina aquellos irritantes o poco irritantes. A nivel práctico tienen poca aplicación en cosmética, ya que el número de productos corrosivos o severamente irritantes con aplicación cosmética es muy limitado.

Respecto a la irritación ocular que se ha mencionado anteriormente, se han desarrollado muchos otros métodos, de los que se han realizado varias validaciones, si bien no han sido aceptados formalmente, aunque en algunos casos existen borradores de protocolos de la OECD.

Entre estos métodos podemos citar:

- Ensayo de ojo aislado de conejo (IRE de las siglas en inglés de *Isolated Rabbit Eye*), similar al método aceptado.

- Ensayo de HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorio Allantoic Membrane). Este método utiliza la membrana corioalantoidea del huevo de gallina. Las lesiones provocadas en la membrana se pueden correlacionar con las lesiones en la conjuntiva y en la córnea del ojo [10]. Se utilizan huevos incubados de 9 días, de los que se expone la membrana corioalantoidea y se aplica el producto. En este caso, se pueden utilizar tanto productos líquidos, como polvos e incluso formulaciones acabadas. Se valora la lesión de la membrana y se pueden clasificar a los productos desde no irritantes a muy irritantes, según un sistema de gradación de la lesión. A pesar de no estar aceptado oficialmente, este método es muy utilizado por la industria cosmética. A su bajo costo, se puede añadir que es fácil de realizar con un cierto entrenamiento y no tiene las limitaciones de solubilidad que presentan otros métodos. Se han realizado algunas adaptaciones del método, como es la utilización del colorante azul de tripano para cuantificar las lesiones ocasionadas en la membrana [11].

- Ensayo de hemólisis como alternativa al test de Draize. Este ensayo se desarrolló para la evaluación del potencial efecto irritante de tensioactivos [13,14]. Se hizo un intento de validación por parte de

EURL-ECVAM si bien los resultados no fueron concluyentes por falta de datos fiables *in vivo*. El método sigue siendo utilizado a nivel de laboratorios cosméticos a nivel interno ya que resulta útil para evaluar tensioactivos o productos que los contengan.

- Modelo reconstruido de córnea humana (Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Method for Identifying Chemicals Not 3 Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage), del cual existe un borrador, reciente de julio de 2014, de protocolo a nivel de la OECD pendiente de ser aprobado. El método se basa en la utilización del ensayo de MTT para valorar el grado de irritación ocular.

- Método del Cytosensor Microphysiometer® (CM) que está actualmente en borrador de la OECD. Este método se basa en un ensayo de citotoxicidad utilizando de fibroblastos L929 cultivados en monocapa sobre un sistema transwell y determinado los cambios de pH mediante un sensor en el aparato. [15]. El principal problema que plantea este método es que requiere de este aparato de producción limitada.

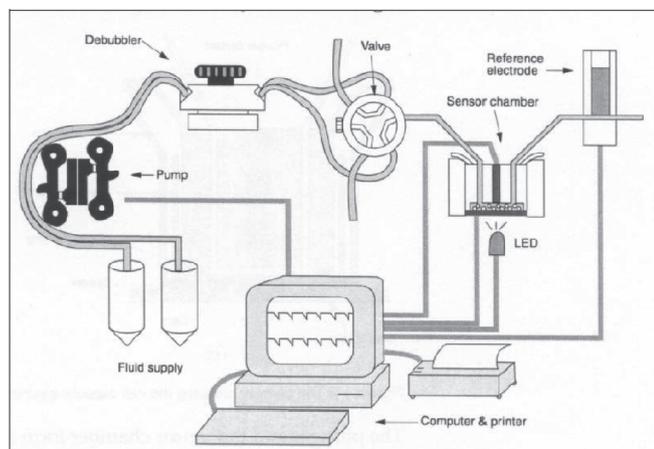


Figura 2. Esquema del Cytosensor Microphysiometer® según aparece en el borrador del protocolo de la guía de la OECD y extraído del manual del aparato.

No existe ningún método alternativo que pueda sustituir de forma única al ensayo con animales, por ello se tiene que utilizar una batería de ensayos y una estrategia para descartar efectos irritantes. La propuesta se basa en la aplicación de un criterio de arriba-abajo o abajo-arriba [16].

1.2.2 Alternativas a los ensayos de irritación/corrosión dérmica

Existen diferentes métodos que han sido oficialmente validados y que aparecen en los protocolos de la OECD:

- Método de la Resistencia Eléctrica Transcutánea (TER) para valorar la corrosión de la piel (OECD 430). El método utiliza piel de rata y mide el cambio en la resistencia eléctrica transcutánea provocada por un producto corrosivo. Al utilizar piel de rata no tiene aplicación en cosmética debido a la prohibición de utilizar animales de laboratorio.

- Método de Corrosión dérmica *in vitro* utilizando piel humana reconstruida (OECD 431). Utiliza MTT para valorar la viabilidad celular.

- Ensayo *in vitro* de irritación dérmica con epidermis humana reconstruida (OECD 439). Este protocolo permite utilizar diferentes modelos de epidermis reconstruida como Episkin™, Epiderm™, SkinEthic™, LabCyte EPI-MODEL24 SIT, así como otros modelos desarrollados similares y que se conocen coloquialmente como los

métodos “me-too”. Se basan así mismo en la cuantificación de la viabilidad o muerte celular mediante el método MTT. Se considera irritante aquel producto que reduce la viabilidad celular en más del 50%.

Para cada uno de los modelos es diferente el tiempo de incubación, el volumen de muestra a aplicar, etc.

Como en el caso de los ensayos de irritación ocular, un único ensayo no es suficiente para clasificar un producto y se necesita más de un ensayo [16].

En los ensayos que utilizan el MTT como método de valoración de la citotoxicidad, se tiene que tener en cuenta la posible interacción con productos coloreados, como es el caso de los tintes capilares. En este sentido se hizo un informe por parte del Comité Científico de Seguridad del Consumidor, expresando sus dudas sobre la utilidad de estos métodos en estos casos [17].

1.3. Sensibilización dérmica

La sensibilización dérmica es una de las principales reacciones adversas de los cosméticos y por ello es de gran importancia valorar el riesgo para el consumidor.

Tradicionalmente, se han utilizado animales como el cobayo, si bien se ha desarrollado un modelo en ratón que cumple con los principios de reducción y de refinamiento y que se ha venido utilizando para ensayar ingredientes cosméticos, hasta la total prohibición del uso de animales. Este método es el conocido como el ensayo del nódulo linfático que fue desarrollado por Basketter y col. [18] y que se recoge en el protocolo de la OECD (OECD 429). Este método permite discriminar el potencial efecto sensibilizante de los productos, existiendo una clasificación de los mismos. El método utiliza timidina marcada radioactivamente para medir la proliferación de linfocitos en los nódulos linfáticos de ratones a los que se administra. Existen modificaciones del protocolo en los que no se utiliza radioactividad. En uno de ellos se mide el contenido de ATP por bioluminiscencia como indicador de la proliferación de linfocitos [19] y en otro protocolo) la medida de la proliferación se basa en la cuantificación de 5-bromo-2-deixiuridina como análogo de la timidina que se determina por un técnica de ELISA [20]. Todos estos métodos representan un alternativa de reducción y de refinamiento pero no son aplicables actualmente a los ensayos de seguridad de ingredientes cosméticos en Europa, debido a la prohibición del uso de animales.

Se han desarrollado varias alternativas *in vitro* cuyos protocolos se encuentra actualmente en fase de borrador en la guía OECD y se aprobaran en los próximos meses. Uno de estos ensayos se conoce como DPRA (Peptide Reactivity assay). El método se basa en que los productos químicos que provocan sensibilización son capaces de reaccionar con proteínas que contienen residuos de lisina y de cisteína [21,22].

Otro método es el denominado KeratinoSens™ o método ARE-Nrf2 luciferasa. Se basa en que los productos sensibilizantes son capaces de producir una inducción de determinados genes que están regulados por una respuesta antioxidante [23,24].

Así mismo también se ha validado el método conocido como h-CLAT (*human cell line activation test*) que se basa en el incremento de la expresión de CD86 y/o CD54 por las células THP-1 en presencia de una sustancia sensibilizante [25]. Estas células son una línea celular de monocitos humanos procedentes de un paciente de leucemia monocítica.

1.4. Absorción dérmica

Los estudios de absorción dérmica se pueden realizar *in vivo*, pero en los últimos años se viene realizando *in vitro*. El ensayo está descrito en el protocolo OECD428. Así mismo el Comité Científico de Seguridad al Consumidor publicó unas recomendaciones de cómo se tenían que realizar los ensayos para estudiar ingredientes cosméticos [26].

El objetivo de los estudios de absorción dérmica es obtener información cuali y cuantitativa de la cantidad de producto que puede pasar a la sangre en condiciones normales de uso. Estas cantidades se tienen en cuenta para calcular el margen de seguridad de un producto cosmético.

Este método utiliza piel humana o de cerdo, de la que se separa la epidermis y se coloca en unas cámaras especiales con dos compartimentos uno donde se aplica el producto y el otro que es el receptor de donde se toman muestras para analizar el contenido del producto que ha atravesado la epidermis.

Se ha de controlar muy bien la integridad de la epidermis que se utiliza, la temperatura de trabajo similar a la fisiológica de la piel ($32\pm 1^\circ\text{C}$), la solubilidad del producto en el líquido receptor, la composición del líquido receptor, la cantidad de producto que se aplica sobre la piel, etc. La cuantificación del producto absorbido se puede realizar por HPLC o utilizando producto marcado radioactivamente.

El comité científico de seguridad del consumidor considera una serie de factores importantes para poder aceptar un estudio de absorción como bueno, entre ellos se requiere un mínimo de 8 muestras procedentes de 4 donantes y que se siga el procedimiento adecuadamente.

1.5. Toxicidad repetida

Los estudios de toxicidad a dosis repetida permiten evaluar los efectos tóxicos que ocurren como resultado de una exposición diaria repetida de una sustancia durante un período concreto de vida del animal. Estos ensayos permiten conocer la toxicidad en órganos diana, curvas de dosis respuesta, respuesta tóxica de metabolitos secundarios formados en el organismo, respuestas tardías, efectos acumulativos y diferencias entre las dosis que no causan efectos adversos de las que causan daño.

Existe una amplia lista de normativas aceptadas para su uso en animales atendiendo a la vía de administración y a la cantidad de días de exposición:

- Dosis repetida (28 días) oral (OECD 407)
- Dosis repetida (28 días) dérmica (OECD 410)
- Dosis repetida (28 días) inhalada (OECD 412)
- Sub-crónica oral: dosis repetida (90 días) en roedores (OECD 408)
- Sub-crónica oral: dosis repetida (90 días) en no roedores (OECD 409)
- Sub-crónica dérmica: dosis repetida (90 días) en roedores (OECD 411)
- Sub-crónica inhalatoria: dosis repetida (90 días) en roedores (OECD 413)
- Toxicidad crónica (OECD 452)

Este tipo de estudios aportan una información muy valiosa para la evaluación de riesgos asociados a productos químicos industriales, ingredientes cosméticos, biocidas, pesticidas y fármacos al aportar la

NOAEL (concentración en la que no se observa efectos adversos), parámetro esencial para el cálculo del Margen de Seguridad (MoS) o el Margen de exposición (MoE)

Actualmente no existe ningún método alternativo aceptado ni validado científicamente o generalmente aceptado para el reemplazo del estudio *in vivo*. Sin embargo se está realizando un esfuerzo importante tal como se demuestra con el número de proyectos europeos actuales que buscan establecer un método alternativo validado científicamente

- EU FP6 *Predictomics project: Short-term models assays for long-term toxicity* (EU contract no 504761). Este estudio trata de establecer una estrategia alternativa para predecir toxicidad crónica en hígado y riñón evaluando conjuntamente datos obtenidos de cultivos celulares avanzados, genómica, proteómica y citómica para detectar lesiones celulares tempranas.

- EU FP6 *Marie Curie Actions Research Training Network PULMONET: Pathogenesis of pulmonary disease* (EU contract no MRTN-CT-2004-512229). Este estudio trata de establecer una estrategia alternativa para predecir toxicidad el sistema pulmonar.

- EU FP7 *Predict-IV project: Profiling the toxicity of new drugs: a non animal-based approach integrating toxicodynamics and biokinetics* (EU Contract no. 202222). Pretende establecer un Sistema y una estrategia *in vitro* basado en la detección biomarcadores neurotóxicos para predecir una toxicidad repetida antes de realizar estudios *in vivo*.

- EU FP7 SEURAT-1: *Towards the replacement of in vivo repeated dose systemic toxicity testing*

1.6. Toxicidad en la reproducción

Estos estudios permiten describir una amplia variedad de efectos adversos inducidos por una sustancia en cualquiera de las fases del ciclo reproductivo de un mamífero. Esto incluye efectos en la fertilidad, comportamiento sexual, implantación embrionaria, desarrollo fetal, adaptación postnatal y la subsiguiente fase de desarrollo hasta la madurez sexual. Así el ensayo sobre la reproducción de la segunda generación (OECD 416) y el ensayo de teratogenia en roedores y no roedores (OECD 414) son los únicos test aceptados.

Según la regulación REACH todo producto manufacturado o importado en cantidades superiores a 10 toneladas debe ser evaluado bajo el ensayo de cribaje en el desarrollo/reproducción (OECD 421) o bien por el ensayo combinado de toxicidad a dosis repetidas y el de criba en el desarrollo/reproducción (OECD 422).

Dado que el campo experimental es muy amplio, no existe un único método alternativo sino una batería de ensayos que cubre la toxicidad durante la fase de desarrollo embrionario (embriotoxicidad). A pesar de estar validados científicamente, no pueden ser usados para ensayos de cuantificación de riesgo siendo solo aptos como métodos preliminares para seleccionar aquellas moléculas potencialmente embriotóxicas y susceptibles de ser evaluadas en estudios *in vivo* [27].

Así existen 3 métodos científicamente validados por la EURL-ECVAM:

- El ensayo con embriones enteros, WEC (DB-ALM Protocol 123): El test se basa en el cultivo de embriones de rata durante el desarrollo de los órganos. La exposición a la sustancia permite detectar letalidad, retrasos en el desarrollo o anomalías e inferencias en la diferenciación. Este test solo es válido para sustancias fuertemente

embriotóxicas.

- El ensayo de micromasas, MM (DB-ALM Protocol 122- The Micromass Test - Method of Brown): El test se basa en el cultivo primario de células neuronales y de los miembros de embriones de rata. La suspensión de células primarias son cultivadas *in vitro*. La distribución de su crecimiento, migración y segregación seguidos del tratamiento con la sustancia permite evaluar un posible potencial embriotoxico para las fases mediana y tardía del desarrollo en mamífero.

- El ensayo de células madre embrionarias, EST (DB-ALM Protocol 113): El test se basa en la determinación de la inhibición de la diferenciación celular combinada con la diferente sensibilidad al daño citotóxico de tejido embrionario y adulto. Se emplean 2 líneas establecidas, ES (D3) como tejido embrionario y fibroblastos (3T3) como tejido adulto. La ausencia de la citoquina leukemia inhibiting factor permite que las células ES formen cuerpos embrioides (EBs) y diferenciándose a tejido contráctil. Estas células son más sensible a agentes tóxicos que las células adultas, estableciendo una relación entre las IC₅₀ de ambas líneas y la respuesta a la diferenciación que permite clasificar las moléculas en no-embriotóxica, moderadamente embriotóxica y fuertemente embriotóxica.

En los últimas décadas, el pez cebra está cobrando importancia como modelo experimental, incluso la OECD ha aceptado un ensayo (OECD 236, FET) en la sección de los efectos bióticos.

1.7. Mutagenicidad/genotoxicidad

La Mutagenicidad hace referencia a cambios permanentes y transmisibles en la cantidad y estructura del material genética de las células. El término clastogenicidad se usa para denominar aquellas sustancias que producen aberraciones estructurales de los cromosomas; pérdida o reordenamiento de segmentos del cromosoma. Mientras que el término aneugenicidad se emplea para referirse a aquellas sustancias que afectan al número de cromosomas. La genotoxicidad hace referencia al proceso por el cual se daña el DNA con la alteración de la estructura, información o segregación, no necesariamente asociada a la Mutagenicidad.

El actual consenso de los grupos científicos internacionales expertos en el tema recomiendan incluir 3 parámetros de genotoxicidad en las pruebas de potencial mutagénico, 1) prueba de Mutagenicidad a nivel génico, 2) otra a nivel de reordenamiento y/o rotura de los cromosomas (clastogenicidad) y 3) una prueba de aberraciones cromosómicas (aneugenicidad).

El campo de la genotoxicidad es el área con un mayor número de estudios alternativos validados.

1) Mutagenicidad:

- Ensayo de mutación inversa en bacterias (OECD 471, test de Ames): La suspensión bacteriana es expuesta a la sustancia a testar en presencia y ausencia de un sistema exógeno de activación metabólica. Posteriormente la solución se somete a una preincubación para posteriormente mezclarse con una capa de agar antes de ser esparcida sobre placas con medio mínimo. Tras 48-72h las colonias revertientes son contadas y comparas con el número de colonias revertientes del control de solvente.

- Ensayo de mutaciones en células de mamíferos, MCM (OECD 476): Se emplean células mutantes deficientes en la proteína Hprt o en la proteína XPRT. Una suspensión celular es expuesta a la sustancia en presencia y ausencia de un sistema exógeno de activación metabólica. Posteriormente son sub cultivadas y mantenidas durante

7-9 días para favorecer la expresión fenotípica mutante. Tras este periodo, la frecuencia de mutación se determina sembrando un número conocido de células en medio con un agente selectivo para detectar colonias mutantes y en medio sin agente de selección para determinar la viabilidad.

2) Clastogenicidad

- Ensayo de micronúcleos *in vitro*, MNT (OECD 487): células de mamífero son expuestas a la sustancia en presencia y ausencia de un Sistema de activación metabólico externo. La exposición será continuada hasta que se produzca la mitosis de las células. Posteriormente las células serán teñidas y serán contados los micronúcleos presentes solamente en células binucleadas (han quedado paradas en esta fase tras la aplicación de citocalasina B) o bien en aquellas células donde se muestren signos de haber tenido división celular.

3) Aneugenicidad

- Ensayo de aberraciones cromosómicas en células de mamífero, ACT (OECD 473): una suspensión de células de mamífero son expuestas al sustancia en presencia y ausencia de un Sistema metabólicos externo para ser posteriormente ser arrestadas en metafase. Finalmente las células en metafase serán analizadas para determinar la presencia de aberraciones cromosómicas.

El Comité SCCS y la agencia europea para la seguridad alimentaria (EFSA) recomienda usar los ensayos de las guías de la OECD 471 y 487 como primer paso para la evaluación de la seguridad de cosméticos y alimentos [28].

Para demostrar que los resultados obtenidos son debidos al tratamiento, es esencial caracterizar la exposición sobre el sistema experimental. En el caso del ensayo de mutación inversa en bacterias una reducción en el número de colonias revertientes es suficiente para demostrar que ha existido exposición a la sustancia. En otros casos, como en la medición de la inducción de micronúcleos o mutaciones génicas, es indispensable que las células hayan entrar en la rueda de replicación al menos una vez.

Actualmente se están incorporando ingredientes en forma de nanopartículas ya que permiten la vehiculización de ingredientes activos a su diana con mayor facilidad. La Unión Europea está haciendo grandes esfuerzos para tratar de establecer nuevas normativas que permitan evaluar la seguridad de estos nuevos ingredientes, ya que determinados ensayos no son adecuados, como por ejemplo el test de Ames, ya que las bacterias no incorporan mecanismo de endocitosis. En estos casos la opción más usada es el ensayo de mutaciones en células de mamífero.

Un problema de estos estudios es que la detección de una molécula como mutágeno es considerada como un mutágeno en modelos *in vitro* y no puede ser corroborado en estudios *in vivo*. Están desarrollando métodos alternativos como por ejemplo, el ensayo de micronúcleos o el ensayo del cometa en piel humana reconstituida o incorporando la variación de los patrones génicos y biomarcadores para predecir la Mutagenicidad del producto de ensayo.

1.8. Carcinogenicidad

Una sustancia es clasificada como carcinogénica si tras ser inhalada, ingerida, expuesta sobre la piel o inyectada, induce tumores (sean malignos o benignos), incrementan su incidencia o malignidad o disminuyen el tiempo de aparición de un tumor. Está generalmente aceptado que la carcinogénesis es un proceso multietapa que incluye la transformación de células normales a tumorales mediante una

series sucesiva de etapas influenciadas por varios factores como pueden ser genéticos y epigenéticos.

El ensayo de transformación celular (CTA, *Cell Transformation Assay*) es el único test recomendado por las instituciones competentes que muestra un modelo más cercano a algunas de las fases de un proceso carcinogénico [29]. El protocolo común y estandarizado final está siendo desarrollado por la OECD como método sustitutivo al test *in vivo*.

El test tiene 2 variantes, según el sistema experimental empleado; o células embrionarias de hámster sirio (SHE) o fibroblastos Balb/C 3T3. Ambas variantes analizan visualmente parámetros específicos relacionados con el fenotipo y patrón de crecimiento celular contando la cantidad de colonias transformantes y el número de focos formados.

Una ventaja adicional del CTA es que permite detectar carcinogénicos genotóxicos y no-genotóxicos en un mismo ensayo. Debido a la relación entre mutaciones y cancerogénesis, los ensayos de genotoxicidad mencionados anteriormente pueden servir como un test preliminar de carcinogénesis. Un resultado positivo en genotoxicidad, puede ser suficiente para valorar la necesidad de llevar a cabo un estudio de cancerogénesis. Debido a la complejidad del proceso de transformación celular a tumores, hoy día el CTA no puede sustituir al método *in vivo*, aunque aporta una información muy valiosa.

1.9. Toxicocinética

Los estudios de toxicocinética permiten describir los fenómenos que experimenta una sustancia desde que entra en contacto con el cuerpo hasta que es eliminado del mismo. La toxicocinética incluye la absorción, distribución, biotransformación y excreción.

En el caso de los cosméticos, se ha hecho una revisión sobre la situación de los métodos alternativos en ensayos de toxicocinética y se ha constatado que todavía existen deficiencias en cuanto a su aplicabilidad [30]. Se necesitan métodos *in vitro* e *in silico* de gran calidad para poder predecir la toxicocinética de los productos.

Existen diferentes modelos *in vitro* que pueden servir para estudiar la absorción de sustancia a través de la piel (modelos de epidermis

reconstruida) o desde el tracto gastrointestinal (cultivos de células Caco-2) [31,32].

También se utilizan modelos tridimensionales de piel para el estudio del metabolismo en la piel [33] o cultivos de hepatocitos para estudiar el metabolismo hepático [34].

Estos métodos no están completamente validados y tan solo representan una parte del proceso.

1.10. Fototoxicidad

Los ensayos de fototoxicidad son requeridos para todos aquellos productos que puedan incrementar su toxicidad por exposición a la luz ultravioleta.

El estudio tradicionalmente se ha hecho con ratas, conejos u otros animales a los que se les rasuraba la piel y se aplicaba el producto y posteriormente se irradiaba la misma con luz ultravioleta y se observaba la lesión provocada en la piel [35].

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* fue el primer método *in vitro* validado [36].

En 2004 se publicó el método bajo el paraguas de la OECD, Ensayo *in vitro* de fototoxicidad 3T3 NRU (OECD TG 432). El método se basa en el estudio de la citotoxicidad de fibroblastos 3T3 mediante el ensayo de captación de rojo neutro. Se compara dicha citotoxicidad en presencia y ausencia de irradiación con luz UV.

Los fibroblastos se cultivan en monocapas y se incuban en placas de 96 pocillos con ocho concentraciones del producto en estudio durante 1 hora. Posteriormente, una de las placas se expone a luz ultravioleta a una dosis no citotóxica y la otra se mantiene en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se sustituye el medio y se mantienen durante 24 horas, transcurridas las cuales se determina la viabilidad celular. Se calcula la CI50 o concentración que reduce la viabilidad en un 50% y se comparan dichos valores para el producto expuesto a la luz y el que no ha estado irradiado.

Finalmente, en la tabla siguiente se resumen los principales métodos alternativos validados para la evaluación de la seguridad de cosméticos, junto con las posibles limitaciones de uso (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de métodos alternativos usados para evaluar la seguridad de ingredientes cosméticos y sus limitaciones

Estudios de toxicología	Métodos alternativos	Limitaciones
Toxicidad aguda	Citotoxicidad (NRU 3T3)	Pendiente protocolo OECD
Irritación ocular	BCOP, ICE	Solo discrimina irritantes severos o corrosivos
	HET-CAM, Hemólisis	No validados
	Cytosensor Microphysiometer®	En fase de aceptación
Irritación dérmica	TER	Solo discrimina irritantes severos o corrosivos
	Episkin™, Epiderm™, SkinEthic™, LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Métodos basados en medición de MTT interferencia con productos colorantes
Sensibilización dérmica	DPRA, Keratinsens®	Pendiente protocolo OECD
Absorción dérmica	Absorción <i>in vitro</i>	No presenta limitaciones
Toxicidad repetida	No existe	
Mutagenicidad/Genotoxicidad	Test Ames, MCM, MNT, ACT	No presenta limitaciones
Carcinogenicidad	CTA	Pendiente protocolo OECD
Toxicidad de la reproducción	EST, WEC, MM, FET	Sólo discriminan fuertemente embriotóxicos
Toxicocinética	Cultivo de Caco2	Sólo valora absorción oral. No está validado
Fototoxicidad	3T3-NRU fototoxicidad	Sólo productos hidrosolubles

Discusión y conclusiones

Desde hace años se venía planteando en Europa la prohibición de los ensayos de cosméticos utilizando animales, por ese motivo se desarrollaron gran número de métodos alternativos, de los cuales

unos han sido validados y aceptados por las autoridades reguladoras y otros se encuentran en fase de validación y/o aceptación.

A pesar de los esfuerzos realizados en este sentido, todavía quedan lagunas por resolver y no todos los métodos alternativos validados

son útiles para todos los productos que se evalúan. En algunos casos existen limitaciones a su aplicación y en otros casos se desconoce la verdadera viabilidad de los resultados obtenidos.

En este sentido, los nanomateriales, son un claro ejemplo, debido a la capacidad que presentan al interferir con los métodos de caracterización utilizados o la propia caracterización o validación del método analítico.

Sin embargo, en las últimas décadas se está aplicando recursos económicos e institucionales al desarrollo de métodos alternativos a la experimentación en animales para dar respuesta a una necesidad social e industrial, en especial la industria cosmética.

Bibliografía

- SCCS. The sccs's notes of guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation. 8th revision 11 december 2012.
- WHO (2001), Approaches to Integrated Risk Assessment, Doc. WHO/IPCS/IRA/01/12 of December 2001
- European Commission (2000) European Commission, DG Health and Consumer Protection. First Report on the Harmonisation of Risk Assessment Procedures, Part 1 . The Report of the Scientific Steering Committee's Working Group on Harmonisation of Risk Assessment Procedures in the Scientific Committees advising the European Commission in the area of human and environmental health (2000), published on the Internet 20.12.2000.
- Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, Kleinjans J, Komulainen H, Kreiling R, Kreysa J, Leite SB, Loizou G, Maxwell G, Mazzatorta P, Munn S, Pfuhrer S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tähti H, Testai E, van Delft J, van Loveren H, Vinken M, Worth A, Zaldivar JM (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol* 85:367-485.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Health Effects and Section 2 Effects on Biotic Systems (Test Guidelines: 236, 401, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 420, 421, 422, 423, 425, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 436, 437, 438, 439, 452, 460, 471, 473, 476, 487): http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.
- ENV/JM/MONO(2010)20 (2010) Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests.
- York M, Steiling W (1998). A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. *J Appl Toxicol* 18:233-240.
- Draize JH, Woodward G, Calvery HO (1944). Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 82:377-390.
- Vinardell MP, Mitjans M (2008) Alternative methods for eye and skin irritation tests. *J Pharm Sci* 97(1):46-59.
- Luepke NP, Kemper FH (1986) The HET-Cam test: An alternative to the Draize eye test. *Food Chem Toxicol* 24:495-496.
- Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T, Tanaka M (1991) Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: Modification of Chorioallantoic membrane test by using trypan blue. *Toxicol In vitro* 5:301-304.
- Vinardell MP, García L (2000) The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. *Toxicol In vitro* 14:55-555.
- Pape WJ, Pfannenbecker U, Hoppe U (1987) Validation of the red blood cell test system as *in vitro* assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol Toxicol* 1:525-536.
- Mitjans M, Martínez V, Clapés P, Pérez L, Infante MR, Vinardell MP (2003) Low potential ocular irritation of arginine-based gemini surfactants and their mixtures with nonionic and zwitterionic surfactants. *Pharm Res* 20:1697-1701.
- Harbell, JSW, Koontz, RW, Lewis, D Lovell and D Acosta (1997) "IRAG Working Group 4: Cell Cytotoxicity Assays. *Food Chem Toxicol* 35, 79-126.
- Scott L, Eskes C, Hoffmann S, Adriaens E, Alépée N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, McNamee P, Osborne R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielman H, Stokes W, Trouba K, Van den Bergh C, Van Goethem F, Vassallo M, Vinardell P, and Zuang V (2010) A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol in vitro* 24, 1-9.
- SCCS/1392/10 SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), memorandum (addendum) on the *in vitro* test EPISKIN™ for skin irritation testing, 14 December 2010.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I and Loveless SE (1996) The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem Toxicol* 34, 985-997.
- Idehara K, Yamagishi G, Yamashita K, Ito M (2008) Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58:1-10.
- Kojima H, Takeyoshi M, Sozu T, Awogi T, Arima K, Idehara K, Ikarashi Y, Kanazawa Y, Maki E, Omori T, Yuasa A, Yoshimura I (2011) Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J Appl Toxicol* 31:63-74.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP (2004) Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Tox Sci* 81:332-343.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Tox Sci* 97:417-427.
- Natsch A (2010) The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Tox Sci* 113,

- 284-292.
24. Emter R, Ellis G, Natsch A (2010) Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 281-290.
 25. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N (2010) Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol In vitro* 26:1150-60.
 26. SCCS/1358/10 SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, 22 June 2010.
 27. Sogorb MA, Pamies D, de Lapuente J, Estevan C, Estévez J, Vilanova E (2014) An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using *in vitro* alternative methods. *Toxicol Lett.* 230(2):356-67.
 28. SCCS/1532/14-Addendum replacing the section 3-4.7 Mutagenicity/Genotoxicity and 3-4.8 Carcinogenicity of the NoG.
 29. EURL EURL-ECVAM (2012) Recommendation on three CTAs for assessment of the carcinogenic potential of chemical substances.
 30. Coecke S, Pelkonen O, Leite SB, Bernauer U, Bessems JG, Bois FY, Gundert-Remy U, Loizou G, Testai E, Zaldívar JM (2013) Toxicokinetics as a key to the integrated toxicity risk assessment based primarily on non-animal approaches. *Toxicol In vitro* 27:1570-7.
 31. Prieto P, Hoffmann S, Tirelli V, Tancredi F, González I, Bermejo M, De Angelis I (2010) An Exploratory Study of Two Caco-2 Cell Models for Oral Absorption: A Report on Their Within-laboratory and Between-laboratory Variability, and Their Predictive Capacity. *ATLA* 38, 367-386.
 32. Turco L, Catone T, Caloni F, Di Consiglio E, Testai E, Stamatii A (2011) Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this *in vitro* model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology in vitro* 25, 13-20.
 33. Hewitt NJ, Edwards RJ, Fritsche E, Goebel C, Aeby P, Scheel J, Reisinger K, Ouédraogo G, Duche D, Eilstein J, Latil A, Kenny J, Moore C, Kuehn J, Barroso J, Fautz R, Pfuhrer S (2013) Use of human *in vitro* skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations. *Tox Sci.* 133:209-17.
 34. Skare JA, Hewitt NJ, Doyle E, Powrie R, Elcombe C (2009) Metabolite screening of aromatic amine hair dyes using *in vitro* hepatic models. *Xenobiotica.* 39:811-25.
 35. Ljunggren B, Möller H (1978) Drug phototoxicity in mice. *Acta Derm Venereol* 58:125-30.
 36. Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJW, Pechovitch G De Silva O, Holzhütter HG, Clothier R, Desolle P, Gerberick F, Liebsch M, Lovell WW, Maurer T, Pfannenbecker U, Potthast J M, Csato M., Sladowski D, Steiling W, and Brantom P (1998) The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3. *Toxic In vitro* 12, 305-327.

Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs

Gómez-Lechón MJ^{1,2}, Tolosa L¹, Donato MT^{1,2,3}

¹Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe). Avda. Fernando Abril Martorell, nº 106- Torre A. 46026 Valencia, Spain. ²CIBEREHD, FIS, Spain. ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Spain.

Recibido 29 de Julio de 2014 / Aceptado 20 de octubre de 2014

Abstract: Drug-induced liver injury is a significant leading cause of liver disease and post-market attrition of approved drugs. Several hepatic cell-based models have been used for early safety risk assessment during drug development. Their capacity to predict hepatotoxicity depends on cells' functional performance. Cultured hepatocytes have contributed to increase knowledge of the metabolic patterns and mechanisms involved in drug toxicity. A major limitation of monolayer hepatocytes is that they undergo rapid loss of hepatic functionality over time, particularly drug metabolising capability. The sandwich culture model promotes polarised cell surface and stabilises hepatocyte functionality, particularly transport systems, better than monolayer cultures. As 3D spatial organisation and complex heterotypic cell interactions are essential for the functional homeostasis of the liver, hepatocyte models (3D cultures, co-cultures with NPCs and microfluidic systems) that mimic cell-cell, cell-matrix interactions and nutrient flow characteristic of the liver microenvironment have been shown to improve the metabolic competency of hepatocytes and have been proposed for better *in vitro* predictions of drug hepatotoxicity. In addition to hepatocytes, other cell-based models have been proposed for hepatotoxicity studies. Hepatoma cell lines are metabolically poor compared to hepatocytes, but offer key advantages, such as unlimited life span, reproducibility, high availability and easy handling, which make them useful for screening purposes. Alternatively, hepatic cell lines engineered for stable or transient expression of key drug-metabolising enzymes have also been used. Finally, stem cell-derived hepatocytes are emerging *in vitro* systems that would provide a stable source of hepatocytes from individuals with highly valuable particular polymorphic characteristics for preclinical drug metabolism and toxicity prediction of new drugs.

Key words: Co-culture, CYP-engineered cell line, hepatocytes, hepatoma cell line, microfluidic device, sandwich culture, spheroids, scaffold-based culture

Resumen: Modelos celulares para predecir la hepatotoxicidad humana de fármacos. La lesión del hígado por fármacos es una de las causas principales de enfermedad hepática y de retirada del mercado de fármacos autorizados. Son varios los modelos de células hepáticas utilizados durante el desarrollo de fármacos para la valoración temprana de su seguridad. Los estudios basados en hepatocitos cultivados han contribuido al conocimiento de los mecanismos implicados en la toxicidad por fármacos. Una limitación fundamental de los hepatocitos cultivados en monocapa es la pérdida temprana de funciones hepáticas, en particular la capacidad para metabolizar fármacos. El cultivo tipo sándwich mantiene la polaridad de los hepatocitos y los sistemas de transporte y estabiliza su

funcionalidad mejor que el cultivo en monocapa. Puesto que la organización espacial 3D y las interacciones celulares heterotípicas son esenciales para la homeostasis funcional del hígado, los hepatocitos cultivados en sistemas que reproducen las interacciones entre células, célula-biomatriz y el flujo de nutrientes característicos del microambiente hepático (cultivos 3D, co-cultivos con células no parenquimales, sistemas microfluidicos) presentan mayor capacidad metabólica y han sido propuestos para mejorar la predicción *in vitro* de la hepatotoxicidad. Otras células hepáticas han sido propuestas como alternativa a los hepatocitos para evaluar la hepatotoxicidad. Si bien las líneas celulares de hepatoma tienen menor capacidad metabólica que los hepatocitos, presentan ventajas clave para el cribado de fármacos (vida ilimitada, reproducibilidad, gran disponibilidad, fácil manejo). También se utilizan células manipuladas para la expresión estable o transitoria de enzimas de biotransformación. Por último, los hepatocitos procedentes de células madre son sistemas *in vitro* emergentes que proporcionarían una fuente estable de hepatocitos, a partir de individuos con características polimórficas especiales, sumamente valiosa para la predicción preclínica de la toxicidad de nuevos fármacos.

Palabras clave: Co-cultivos, células manipuladas genéticamente que expresan CYPs, hepatocitos, líneas celulares de hepatomas, cultivo en sandwich, esferoides, cultivos en soportes tridimensionales.

Introduction

Drug-induced liver injury (DILI) is one of the most important issues in drug development as a leading cause of discontinuation of clinical trials and withdrawal or black box warnings of approved drugs [1]. DILI is a complex phenomenon which encompasses a spectrum of clinical disease ranging from mild biochemical abnormalities to acute liver failure. Hepatotoxicity can be induced by a drug itself or indirectly by the generation of reactive metabolites (bioactivation) (Figure 1). Toxic injury to hepatocytes is produced through multiple mechanisms involving damage to biomolecules, alteration of cell homeostasis/function and cell death [2].

Early safety assays during drug development are directed to reduce potential risk of toxicity to humans, however, preclinical testing in laboratory animals often fails to predict DILI. This poor predictivity is attributable to several reasons, including differences in drug metabolism and toxicity between human and experimental species [3,4]. In this scenario, different *in vitro* approaches have been explored to improve and accelerate the identification of hepatotoxicity induced by drugs. In particular, several hepatic cell-based screening protocols have been incorporated in drug

* e-mail: gomez_mjo@gva.es

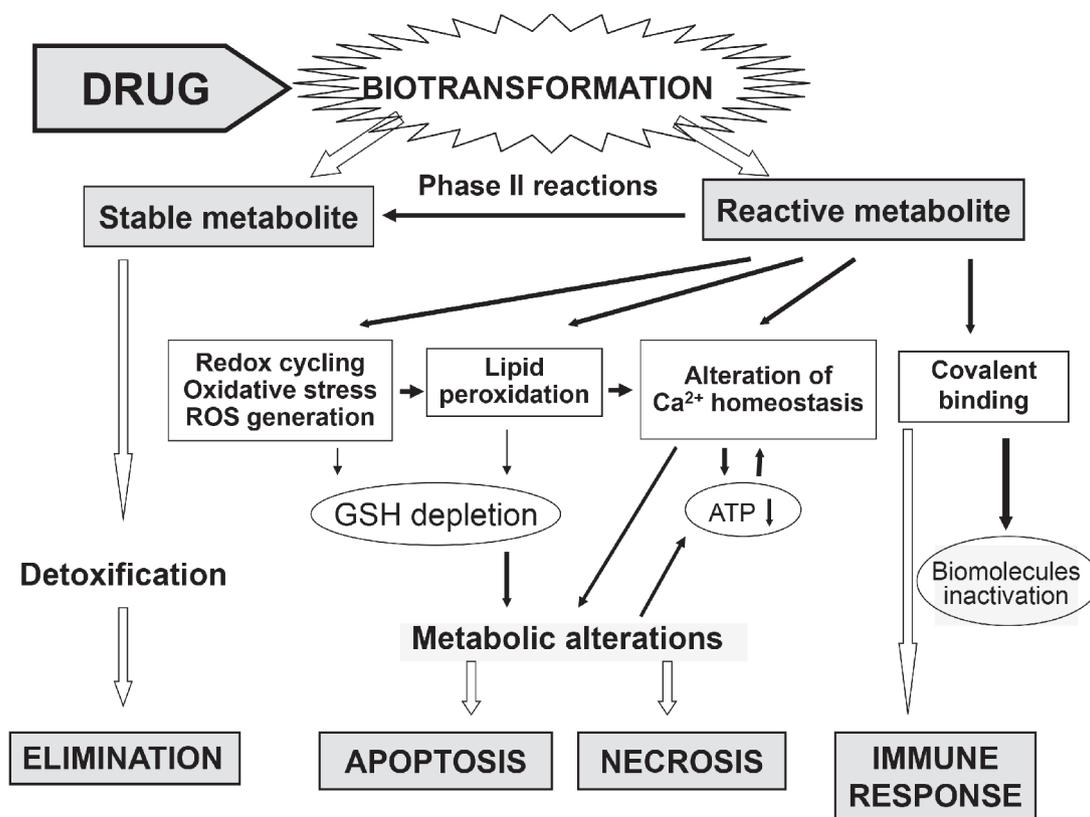


Figure 1. Molecular events leading to drug-induced liver cell damage and death. Drugs may act directly on cellular systems or after biotransformation by hepatocytes. In the latter case, toxicity is ultimately the balance between bioactivation and detoxification, which determines whether a reactive metabolite elicits a toxic effect or not. There are several processes known to play a role in the molecular events leading to irreversible cell damage and cell death by either necrosis or apoptosis.

development for early safety risk assessment [4-7]. Their capacity of predicting *in vivo* hepatotoxicity depends critically on the functional activities of the cell types used in each screening platform.

This paper presents the most valuable cell models for human hepatotoxicity predictions including cultures of hepatocytes in different 2D and 3D configurations as well as alternative cells to hepatocytes such as hepatoma cell lines, CYP-engineered cells and stem cell-derived hepatocytes. Major features, advantages and drawbacks of the different cell models are discussed.

2D culture models of hepatocytes

For decades, 2D-cultures of hepatocytes have been widely used for *in vitro* predictions of *in vivo* metabolic pathways and hepatotoxicity of drugs (Figure 2). Such cell models offer the advantages of being relatively inexpensive, reproducible, robust and convenient. Cultured hepatocytes from different experimental species, particularly rat and mouse, have been used. However, human hepatocytes have been considered the gold standard *in vitro* model for the prediction of drug metabolism and the assessment of hepatotoxicity [8-12], because qualitative and quantitative interspecies differences in drug-metabolising enzymes frequently make the extrapolation of drug metabolism and hepatotoxic effects from animal hepatocytes to man difficult.

Monolayer cultures involve plating cells on a rigid substratum pre-treated with extracellular matrix (ECM) proteins (collagen, fibronectin or Matrigel) [11,12], where they maintain key hepatic-specific functions [8-12]. However, one major drawback of monolayer cultures is that they undergo a rapid loss of hepatic

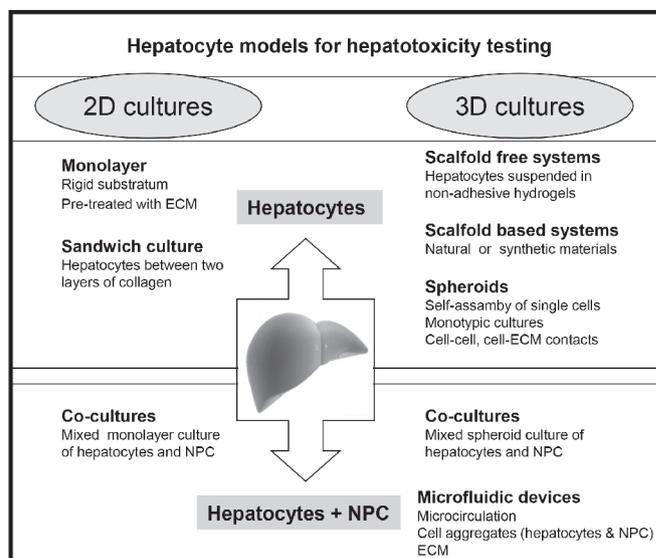


Figure 2. Hepatocyte models as tools for hepatotoxicity studies. The models extend from well-established hepatocyte culture models comprising a 2D monolayer and collagen-sandwich configuration, followed by emerging complex 3D hepatic cellular models including scaffold-based models, aggregates and microfluidic devices.

functionality over time, particularly drug metabolising capability, which confers them a short, limited sensitivity to drug hepatotoxicity detection [5,7,8,10,11] (Table 1).

Table 1. Hepatocyte culture models for hepatotoxicity testing

Models	Advantages	Disadvantages
2D Cultures of hepatocytes		
<i>Monolayer cultures</i>	Expression of CYP and Phase II enzymes Short-time inducibility of CYPs by xenobiotics Model of choice (human hepatocytes) for drug screening: metabolic profiling, drug-drug interaction, hepatotoxicity Good transferability of data to human data (human hepatocytes)	Short-term preservation of functionality Loss of cell polarity Limited availability (human liver) Donor to donor variability (human) Low resistance to cryopreservation Difficult transferability of data to human data (rodent hepatocytes)
<i>Sandwich cultures</i>	Higher cell viability, survival and expression of CYP and Phase II enzymes than monolayer cultures Inducibility of CYP enzymes by xenobiotics Retention of morphology, functional bile canaliculi and cell-cell contacts Good transferability of data to human data (human hepatocytes)	Difficult transferability of data to human data (rodent hepatocytes) Limited availability of human liver Donor to donor variability (human)
<i>Co-cultures of several liver-derived cell types</i>	Improved longevity/functionality of all cell types High expression of CYP and Phase II enzymes Inducibility of CYP enzymes by xenobiotics Retention of morphology, bile canaliculi and cell-cell contacts Good transferability of data to human data (human hepatocytes)	No standard as to which other cell type to use
3D Cultures of hepatocytes		
<i>Scaffold-based systems/ Spheroids</i>	Long-term maintenance of liver specific functions, CYP and Phase II enzymes and inducibility of CYP enzymes by xenobiotics High level of hepatic transporters Preserved liver-specific polarity Possibility of using for chronic toxicity and repeated dose Good transferability of data to human data (human hepatocytes)	In some 3D models there is formation of necrotic cores Techniques need to be improved to be applicable for highthroughput
<i>Co-cultures of liver derived cell types</i>	Longer expression of CYP and Phase II enzymes and inducibility of CYP enzymes by xenobiotics Intercellular interactions and communication Preserved liver-specific polarity Mimic liver cyto-organization	Variability of viability and differentiation status depending on culture conditions Techniques need to be improved to be applicable for highthroughput
<i>Microfluidic devices</i>	Incorporate shear flow Promote round cell aggregates more similar to <i>in vivo</i> morphology Sustained liver-like cell functionality Preserved liver-specific polarity Allow the possibility to precisely adjust flow rates and metabolite or drug concentrations in the medium Better correlation with <i>in vivo</i> data compared with static hepatocyte cultures and this correlation further improved in co-cultures Possibility of microscopic examination	Emerging technology Variability of viability and differentiation status depending on culture conditions Does not maintain viability/ functionality longer than other 3D methods

In an attempt to maintain liver-specific functionality over longer culture periods, a sandwich configuration was developed (Table 1). Hepatocytes are placed between two matrix layers, traditionally collagen or Matrigel. Maintaining hepatocytes in a sandwich culture prevents cell viability loss, enhances secretion of organic compounds, including urea and albumin, increases basal and induced drug-metabolising enzyme activities, and mimics *in vivo* biliary excretion rates [9,11,13,14]. Therefore, it has been suggested that the sandwich culture model is most useful for mechanistic studies of hepatobiliary toxicity [13,15-17]. This is important because biliary efflux activity is inhibited by various drugs that cause iatrogenic cholestasis, an important mechanism of DILI [18].

3D culture models of hepatocytes

As a result of the failure to predict hepatotoxic drugs in preclinical testing using traditional hepatocyte cultures, alternative models to phenotypically stabilise liver cell functions over a long period of time have been developed (Figure 2). They are based in recreating microenvironmental cues *in vivo*, such as a 3D architecture, multiple cell types, cell-cell and cell-matrix interactions, soluble factors, and dynamic nutrient flow which appear promising for drug screening and predicting drug efficacy and toxicity in humans. 3D liver cell models, which are amenable to routine use and high-throughput adaptation, are particularly desirable for industrial drug discovery to allow the realistic assessment of drug metabolism and adverse/toxic effects [5,19]. Advantages and disadvantages of the different models are summarized in Table 1.

Scaffold-based systems

3D cultures can be produced by embedding hepatocytes in scaffold-free and scaffold-based systems (for a review, see [5,19]). The former consists in suspending cells in non-adhesive hydrogels (i.e., alginate, Matrigel, collagen, self-assembling peptides) with subsequent polymerisation that aims to culture the hepatocytes encapsulated within a gel [20]. Scaffold-based systems involve seeding cells on 3D solid matrices; e.g., derived from natural materials (decellularised liver-derived ECM) or synthetic materials (e.g., alginate, polystyrene) [19,21]. While naturally derived substrates offer advantages in biocompatibility terms, and mimic cell-matrix interactions, synthetic scaffolds offer reproducibility and stability. Interconnected porous networks and the pore size of 3D scaffolds are very important for ensuring spatially uniform cell distribution, cell migration and cell survival, which all affect the diffusion of physiological nutrients and gases and the removal of metabolic waste. The currently available wide range of synthetic polymers opens up many opportunities for cell-specific tailored scaffolds. For example, the specific affinity of hepatocytes to the galactose residue has led to a range of synthetic scaffolds that present galactose on the surface for improved hepatocyte adhesion and function [5,22].

Multicellular spheroids

Hepatocytes can be re-aggregated by cellular self-assembly and by re-establishing cellular contacts to reform a 3D configuration. The fundamental concept is that suspended isolated hepatocytes are capable of reforming 3D tissue or spheroids if adhesion to a substrate

is prevented. Sustained cellular contacts are key for maintaining hepatic differentiation and functionality in spheroids [23] (for a review see [5]). In general, an intact actin cytoskeleton is required for the self-assembly and differentiation of liver cell spheroids [23]. The size of spheroids is critical since spheroids larger than 200-300 µm are at risk of having necrotic cores since oxygen diffusion is the most limiting parameter [5]. Spheroids can be created by various methods [5]: (1) spontaneous self-assembly in non-adhesive wells/dishes under static conditions; (2) agitation or microcavities; and (3) in a hanging drop. Several reports indicate an excellent long-term viability of human hepatocyte spheroids to preserve liver-specific polarity, the expression and activity of phase I and phase II drug-metabolising enzymes and induction. Thus, they appear to be a suitable model for discovering drug metabolites and long-term drug hepatotoxicity testing, such as the repeated-dose format and high-throughput systems [24].

3D co-cultures of hepatocytes and non-parenchymal cells

The liver comprises two major cell populations, hepatocytes and non-parenchymal cells (NPCs), including endothelial, stellate and Kupffer cells, among others. The cell-cell communication between hepatocytes, and between hepatocytes and NPCs, and also with the ECM, is a prerequisite for maintaining a differentiated phenotype and required for the *in vivo* functional homeostasis of the liver. Moreover, NPCs are considered important modulators of idiosyncratic hepatotoxicity. Thus, the use of co-cultures of hepatocytes and NPCs could further enhance the *in vivo*-like characteristics of a 3D culture device and provide more predictive results.

Spheroid systems that co-culture rat hepatocytes with hepatic stellate cells, the HSC-T6 cell line, HUVEC cells or Kupffer cells have been developed, and it has been underlined the relevance of these complex and long-lasting hepatic cell culture models [57]. More recently, a 3D scaffold co-culture of human hepatocytes, stellate, Kupffer and endothelial cells has been reported to maintain well-preserved composition and liver function for up to 3 months [25]. Therefore, presence of NPCs not only contribute to prolong the survival and to improve the function of hepatocytes in culture, but can also increase

their sensitivity for DILI detection involving inflammatory mediators [25].

Microfluidic devices

In vitro microfluidic systems have been more recently developed to better mimic the *in vivo* situation due to better hepatocyte functionality [26]. Incorporating fluid flow into 3D culture systems is an important step for combating poor oxygen and nutrient diffusion issues through spheroids and aggregates of cells and ECM. The overall goal of many such efforts is to form a fully functional liver culture model that mimics the complex *in vivo* architecture of a liver lobule, and which can be used for toxicological and pharmacological research or can be modified in a bio-artificial liver for clinical use (for a review, see [5,19]). One real advantage is the possibility of precisely adjusting flow rates and metabolite or drug concentrations in the medium to mimic various physiologic conditions of blood, such as postprandial and starvation states or circadian cycles of hormone and metabolite concentrations. These devices preserve cell viability and the metabolic competency of human hepatocytes at higher levels than under static culture conditions [26-28]. The utility of these models for toxicity testing has been explored through the prediction of *in vivo* clearance rates. It has been demonstrated that the data from these systems are more correlative with *in vivo* data than those deriving from static hepatocyte cultures, and that this correlation improved further when co-cultures were used [28,29].

Hepatoma cell lines

Although human hepatocytes are the preferred cells for drug metabolism and hepatotoxicity studies, their scarce availability, inter-donor variability, short life span, and decreased metabolic capacity along culture time limit their routine use for screening purposes. Several human hepatoma cell lines (e.g., HepG2, Hep3B, Huh7, HepaRG) have been proposed as alternative cell models to hepatocytes [30]. These cells offer key advantages over hepatocytes such as their high availability, unlimited life span, stable phenotype, reproducibility, and easy handling (Table 2), which make them useful *in vitro* systems for drug safety assessment [30,31].

Table 2. *Alternative cell sources to hepatocytes for hepatotoxicity testing*

Models	Advantages	Disadvantages
Hepatoma cell lines	Highly proliferative, unlimited available cells Easy handling and relative low cost Standardized culture conditions Relative stable gene expression pattern Robustness and good experimental reproducibility Some cell lines retain certain liver-specific functions and drug-metabolizing capacity (i.e., HepaRG) Suitable to high throughput screenings Possibility of culturing in 3D configuration (enhanced functionality)	Undifferentiated phenotype characteristic of proliferative tumor cells Poor expression of some functions of adult human liver Altered expression of key transcription factors Scarce levels of certain CYP enzymes (depending on cell line) Absence on non-parenchymal cells Difficult transferability of data to normal (non-malignant) human liver
CYP-transfected cell lines	High activity levels of transfected enzymes Useful for metabolism-based toxicity studies High reproducibility and phenotypic stability (stably transfected cell lines) Identification of CYPs involved in the generation of toxic metabolites Controllable expression of functional CYPs (adenovirus-transfected cells) Tailored reproduction of metabolic phenotypes (multiple adenoviral co-transfection)	Unbalanced drug metabolism (cells over-expressing a single CYP) Potential altered expression of other hepatic functions More correlation studies to <i>in vivo</i> hepatotoxicity are required Uncontrollable risk of mutagenic effects (stably transfected cell lines) Transient expression systems require the generation of a new cell lot for each study (potential variability, time-consuming)
Induced pluripotent stem cells-derived hepatocytes	Stable genetic background High availability Defined phenotype Allow studies of inter-individual variability Possibility of culturing in 3D configuration (enhanced functionality)	Complex reprogramming steps Limited expression of liver-specific genes Variability in phenotype among preparations Few studies in toxicology yet

Most hepatoma cell lines express many liver differentiated functions; however, in general, they show a poor expression of drug metabolising enzymes (CYPs, conjugating enzymes) and transport proteins compared to primary hepatocytes [31-33]. Despite these shortcomings, hepatoma cells have been extensively used for cytotoxicity evaluations and to examine specific mechanisms of toxicity. In particular, HepG2, the best characterised human hepatoma, is one of the most currently used human cell models for hepatotoxicity screenings. As a result of this widespread use, exhaustive data on the effects of a huge number of compounds (model hepatotoxins, drugs, chemicals) on many parameters indicative of toxicity to HepG2 cells (viability, membrane integrity, cell proliferation, ATP level, etc.) are available in the literature [6,34,35]. Recently, multiplexed high content screening and automated assays adapted to HepG2 miniaturised culture formats (e.g., 96- or 386-well plates) have been proposed as valuable prioritisation tools during preclinical drug development [36,37]. These multiparametric assays have been applied to screen large series of compounds and have shown acceptable specificity and sensitivity to discriminate between hepatotoxic and non-hepatotoxic drugs.

HepaRG is a recently derived hepatoma cell line that is now considered the most promising cell model as a surrogate for human hepatocytes in *in vitro* assessments. Proliferating HepaRG are bipotent progenitor cells capable of differentiating into hepatocyte-like and biliary-like cells [38]. After several weeks of culture in the presence of DMSO, confluent monolayers of HepaRG cells differentiate towards a hepatocyte-like phenotype with bile canaliculi structures formation [38]. Differentiated HepaRG are now increasingly used in hepatotoxicity studies as they show important advantages over HepG2 and other hepatoma cells: 1) greater levels of phase I and phase II drug-metabolising enzymes, which enables the detection of toxic effects of reactive metabolites; 2) a polarised expression of the hepatobiliary membrane transporters required to identify toxicity due to the alteration of the normal function of hepatic uptake or efflux transporters; and 3) a stable metabolic competence for several weeks, which opens up the possibility of performing long-term repeated-dose studies for chronic toxicity assessment [32,39,40]. However, the demanding culture requirements, long-term differentiation protocols and high DMSO concentrations required to maintain differentiated HepaRG cultures are major drawbacks for their widespread use in hepatotoxicity testing [39,40].

Research efforts have been made to improve the functional capacity of hepatoma cell lines and to promote their performance for drug safety evaluation. Different 3D culture techniques (e.g., microencapsulation, cell spheroids or micro-space cell culture systems) have been explored to improve differentiation and the hepatic phenotype of HepG2 or HepaRG cells. Similarly to hepatocytes, hepatoma cells grown in 3D systems have exhibited better viability and functionality than in conventional 2D cultures [41-43]. Therefore, these 3D organotypic cultures have been proposed as relevant alternative systems for the more accurate assessment of human hepatotoxicity and for metabolism-mediated drug toxicity screenings [41-43].

CYP-transfected hepatic cell lines

Hepatotoxicity can be produced after bioactivation of the drug by biotransformation enzymes (mainly CYPs) into reactive metabolite(s) (Figure 1). The identification of bioactivable molecules requires the use of metabolic competent systems capable of generating toxic metabolites. Several cell systems based on liver-derived cell lines engineered to express high levels of CYPs (and other drug-

metabolising enzymes) have been developed as *in vitro* tools for drug metabolism and hepatotoxicity studies [30]. These metabolically competent cells are generated by transfection with vectors encoding for human CYPs resulting in stable or transient expression of the transgene [5,30]. In contrast to primary hepatocyte cultures, transfected cell lines show high levels of CYP activities along time in culture and offer the advantages of robustness and good experimental reproducibility; however important limitations of these cells is that transfection strategies can potentially alter the expression of other hepatic functions and overexpression of a particular enzyme may result in unbalanced metabolism and (Table 2).

Among cell lines manipulated for stable expression of drug-metabolising transgenes, those generated by the transfection of SV40 large T-antigen-immortalised human liver epithelial (THLE) cells or HepG2 cell line are the most widely used for hepatotoxicity assessment of bioactivable drugs [44,45]. Each CYP-transfected THLE or HepG2 cell line stably express high levels of an individual human CYP [45]. A study strategy based on the comparison of the effects of a particular drug to CYP-transfected cells and to parental non-CYP expressing cells has enabled the contribution of CYP-mediated metabolism to toxicity to be explored [44-46]. However, no more than one or two enzymes can be satisfactorily transfected into cells, and expression levels are often too high or low when compared to human liver/hepatocytes [46].

As an alternative, upgraded HepG2 cells generated by adenoviral-mediated CYP expression have been proposed for hepatotoxicity studies [30,47-49]. Adenoviral transduction has allowed the easily modulated and controlled expression of multiple transgenes (up to five CYPs) in host cells [5,48,49]. Then by selecting appropriate mixtures of adenoviral constructs, cells customised with a particular CYP profile (metabolic phenotype) can be produced [30]. The versatility of these cell-based assays opens up the possibility of making *in vitro* hepatotoxicity predictions to different population groups (e.g., extensive *vs* poor metabolisers). However, one limitation of this strategy is that transgene expression is transient and a new transfection must be performed for each experiment.

Pluripotent stem cells-derived hepatocytes

Human pluripotent stem cells-derived hepatocytes are emerging as cell-based systems that will potentially provide a stable source of hepatocytes for reliable and high-throughput screening for the metabolism and toxicity of candidate compounds. Different groups have developed protocols to isolate embryonic stem cells (ESCs) and induce them to form hepatocyte-like cells by mimicking the developmental pathway of the liver during embryogenesis [7,50]. However, the broad variability reported by distinct laboratories of the key enzymes implicated in drug metabolism in differentiated ESCs implies that the application of these cells in toxicity studies is still premature. Recent studies have focused on the 3D culture of ESCs for toxicity testing [51].

Human induced-pluripotent stem cells (iPSCs) are an attractive source of normal human cells because they possess self-renewing potency and pluripotency, and can differentiate into virtually any somatic cell type, like hepatocytes. They may provide a limitless supply of hepatocytes for high-throughput screening with minor batch variability from multiple individuals to improve reproducibility and to enable testing of individual-specific toxicity [7,52,53]. Hepatocyte-like cells differentiated from iPSCs recapitulate many hepatic functional properties. However, current hepatic differentiation protocols result in cells with lower levels of

enzyme activity and hepatic gene expression profiles than intact human liver or human isolated hepatocytes [54,55]. Perhaps in the future, iPSC-hepatocytes generated from individuals with different CYP polymorphisms would be of great value for the drug metabolism and toxicity prediction of new drugs in pre-clinical stages to enable more successful clinical trials [53,55,56].

References

- Norris W, Paredes AH, Lewis JH (2008) Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 24: 287-297.
- Gomez-Lechon MJ, Tolosa L, Castell JV, Donato MT (2010) Mechanism-based selection of compounds for the development of innovative *in vitro* approaches to hepatotoxicity studies in the LIINTOP project. *Toxicol In Vitro* 24: 1879-1889.
- Lewis DF, Ioannides C, Parke DV (1998) Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environ Health Perspect* 106: 633-641.
- O'Brien PJ, Chan K, Silber PM (2004) Human and animal hepatocytes *in vitro* with extrapolation *in vivo*. *Chem Biol Interact* 150: 97-114.
- Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Böttger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gómez-Lechón MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Häussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhütter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH, Stieger B, Stöber R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Wiedera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM, Hengstler JG (2013) Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 87: 1315-1530.
- O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Coffield E, Krejsa CM, Slaughter MR, Gao B, Kaludercic N, Angeline A, Bernardi P, Brain P, Hougham C (2006) High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol* 80: 580-604.
- Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, Rusyn I (2013). Models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* 2: 23-39.
- Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT (2008) An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4: 837-854.
- Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 4: 292-312.
- Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R (2004) Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* 5: 443-462.
- Hewitt NJ, Gómez-Lechon MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GM, Hengstler JG (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39: 159-234.
- LeCluyse EL (2001) Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 13: 343-368.
- Meng Q. Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6:733-46.
- Kienhuis AS, Wortelboer HM, Maas WJ, van Herwijnen M, Kleinjans JC, van Delft JH, Stierum RH (2007) A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling. *Toxicol In Vitro* 21: 892-901.
- Chatterjee S, Richert L, Augustijns P, Annaert P (2014) Hepatocyte-based *in vitro* model for assessment of drug-induced cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol* 274: 124-136.
- De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolai J, Augustijns P, Annaert P (2013) Sandwich-cultured hepatocytes: utility for *in vitro* exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9: 589-616.
- Marion TL, Perry CH, St Claire RL, Brouwer KL (2012) Endogenous bile acid disposition in rat and human sandwich-cultured hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 261: 1-9.
- Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83: 633-671.
- Mueller D, Heinzle E, Noor F (2013) 3D Hepatic *In Vitro* Models as Tools for Toxicity Studies. *Current Tissue Eng* 2: 78-89.
- Lau TT, Lee LQ, Leong W, Wang DA (2012) Formation of model hepatocellular aggregates in a hydrogel scaffold using degradable genipin crosslinked gelatin microspheres as cell carriers. *Biomed Mater* 7:065003.
- Kim BS, Park IK, Hoshiba T, Jiang HL, Choi YJ, Akaike T, Cho CS (2011) Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 36: 238-268.
- Cho CS, Seo SJ, Park IK, Kim SH, Kim TH, Hoshiba T, Harada I, Akaike T (2006) Galactose-carrying polymers as extracellular matrices for liver tissue engineering. *Biomaterials* 27: 576-585.
- van Zijl F, Mikulits W (2010) Hepatospheres: Three dimensional cell cultures resemble physiological conditions of the liver. *World J Hepatol* 2: 1-7.
- Tostoes RM, Leite SB, Serra M, Jensen J, Bjorquist P, Carrondo MJ, Brito C, Alves PM (2012) Human liver cell spheroids in extended perfusion bioreactor culture for repeated-dose drug testing. *Hepatology* 55: 1227-1236.
- Kostadinova R, Boess F, Applegate D, Suter L, Weiser T, Singer

- T, Naughton B, Roth A (2013) A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 268: 1-16.
26. Chao P, Maguire T, Novik E, Cheng KC, Yarmush ML (2009) Evaluation of a microfluidic based cell culture platform with primary human hepatocytes for the prediction of hepatic clearance in human. *Biochem Pharmacol* 78: 625-632.
 27. Goral VN, Hsieh YC, Petzold ON, Clark JS, Yuen PK, Faris RA (2010) Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants. *Lab Chip* 10: 3380-3386.
 28. Novik E, Maguire TJ, Chao P, et al. A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochem Pharmacol* 2010; 79:1036-44.
 29. Bhushan A, Senutovitch N, Bale SS, McCarty WJ, Hegde M, Jindal R, Golberg I, Berk Usta O, Yarmush ML, Verneti L, Gough A, Bakan A, Shun TY, DeBiasio R, Lansing Taylor D (2013) Towards a three-dimensional microfluidic liver platform for predicting drug efficacy and toxicity in humans. *Stem Cell Res Ther* 4 Suppl 1: S16.
 30. Donato MT, Jover R, Gomez-Lechon MJ (2013) Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab* 14: 946-968.
 31. Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2008) Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* 9: 1-11.
 32. Kanebratt KP, Andersson TB (2008) Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos* 36: 1444-1452.
 33. Guo L, Dial S, Shi L, Branham W, Liu J, Fang JL, Green B, Deng H, Kaput J, Ning B (2011) Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 39: 528-538.
 34. Schoonen WG, Westerink WM, de Roos JA, Débiton E (2005) Cytotoxic effects of 100 reference compounds on Hep G2 and HeLa cells and of 60 compounds on ECC-1 and CHO cells. I mechanistic assays on ROS, glutathione depletion and calcein uptake. *Toxicol In Vitro* 19: 505-516.
 35. Schoonen WG, Stevenson JC, Westerink WM, Horbach GJ (2012) Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: Mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpress and NAD(P)H production with Alamar Blue. *Toxicol In Vitro* 26: 511-525.
 36. Tolosa L, Pinto S, Donato MT, Lahoz A, Castell JV, O'Connor JE, Gómez-Lechón MJ (2012) Development of a Multiparametric Cell-based Protocol to Screen and Classify the Hepatotoxicity Potential of Drugs. *Toxicol Sci* 127: 187-198.
 37. Garside H, Marcoe KF, Chesnut-Speelman J, Foster AJ, Muthas D, Kenna JG, Warrior U, Bowes J, Baumgartner J (2014) Evaluation of the use of imaging parameters for the detection of compound-induced hepatotoxicity in 384-well cultures of HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 28: 171-181.
 38. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34: 75-83.
 39. Rodrigues RM, Bouhifd M, Bories G, Sacco MG, Gribaldo L, Fabbri M, Coecke S, Whelan MP (2013) Assessment of an automated *in vitro* basal cytotoxicity test system based on metabolically-competent cells. *Toxicol In Vitro* 27: 760-767.
 40. Klein S, Mueller D, Schevchenko V, Noor F (2013) Long-term maintenance of HepaRG cells in serum-free conditions and application in a repeated dose study. *J Appl Toxicol* 2013; doi: 10.1002/jat.2929.
 41. Ramaiahgari SC, den Braver MW, Herpers B, Terpstra V, Commandeur JN, van de Water B, Price LS (2014) A 3D *in vitro* model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol* 88: 1083-1095.
 42. Mueller D, Kramer L, Hoffmann E, Klein S, Noor F (2014) 3D organotypic HepaRG cultures as *in vitro* model for acute and repeated dose toxicity studies. *Toxicol In Vitro* 28: 104-112.
 43. Gunness P, Mueller D, Shevchenko V, Heinzle E, Ingelman-Sundberg M, Noor F (2013) 3D organotypic cultures of human HepaRG cells: a tool for *in vitro* toxicity studies. *Toxicol Sci* 133: 67-78.
 44. Dambach DM, Andrews BA, Moulin F (2005) New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of *in vitro* models. *Toxicol Pathol* 33: 17-26.
 45. Gustafsson F, Foster AJ, Sarda S, Bridgland-Taylor MH, Kenna JG (2014) A correlation between the *in vitro* drug toxicity of drugs to cell lines that express human P450s and their propensity to cause liver injury in humans. *Toxicol Sci* 137: 189-211.
 46. Greer ML, Barber J, Eakins J, Kenna JG (2010) Cell based approaches for evaluation of drug-induced liver injury. *Toxicology* 268: 125-131.
 47. Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi, P.; Kanter, R.; Monshouwer, M (2005) An *in vitro* approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology* 216: 154-167.
 48. Tolosa L, Donato MT, Perez-Cataldo G, Castell JV, Gómez-Lechón MJ (2012) Upgrading cytochrome P450 activity in HepG2 cells co-transfected with adenoviral vectors for drug hepatotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro* 26: 1272-1277.
 49. Tolosa L, Gomez-Lechon MJ, Perez-Cataldo G, Castell JV, Donato MT (2013) HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Arch Toxicol* 87: 1115-1127.
 50. Baxter MA, Rowe C, Alder J, Harrison S, Hanley KP, Park BK, Kitteringham NR, Goldring CE, Hanley NA (2010) Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening. *Stem Cell Res* 5: 4-22.
 51. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H (2013) 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing.

- Biomaterials 34: 1781-1789.
52. Katsuda T, Sakai Y, Ochiya T (2012) Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes as an alternative to human adult hepatocytes. *J Stem Cells* 7:1-17.
 53. Yi F, Liu GH, Izpisua Belmonte JC (2012) Human induced pluripotent stem cells derived hepatocytes: rising promise for disease modeling, drug development and cell therapy. *Protein Cell* 3: 246-250.
 54. Guguen-Guillouzo C, Corlu A, Guillouzo A (2010) Stem cell-derived hepatocytes and their use in toxicology. *Toxicology* 270: 3-9.
 55. Medine CN, Lucendo-Villarin B, Storck C, Wang F, Szkolnicka D, Khan F, Pernagallo S, Black JR, Marriage HM, Ross JA, Bradley M, Iredale JP, Flint O, Hay DC (2013) Developing high-fidelity hepatotoxicity models from pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2: 505-509.
 56. Anson BD, Kolaja KL, Kamp TJ (2011) Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clin Pharmacol Ther* 89: 754-758.

Métodos computacionales en toxicología predictiva: aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH

Gozalbes R^{1*}, de Julián-Ortiz JV¹, Fito-López C²

¹ProtoQSAR SL, Vivero de Empresas Creix, Paseo de la Pechina 15, 46008 Valencia. ²Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística (ITENE), Parque Tecnológico de Valencia, C/ Albert Einstein 1, 46980 Paterna (Valencia).

Recibido 12 septiembre de 2014 / Aceptado 29 octubre de 2014

Resumen: Los métodos de química informática y modelado molecular han sido utilizados desde hace décadas para la selección y optimización de nuevos compuestos con propiedades terapéuticas. Su aplicación en toxicología predictiva es más reciente, y dadas las nuevas necesidades regulatorias impuestas por la normativa europea REACH, estas técnicas gozan actualmente de un interés creciente. En efecto, el reglamento REACH supone a priori la necesidad de una cantidad ingente de ensayos con animales para demostrar la seguridad de los nuevos compuestos químicos sometidos a registro, ensayos que pueden reducirse mediante el uso de métodos alternativos como los estudios *in vitro* e *in silico*, siempre que cumplan ciertas condiciones específicas que garanticen su calidad y eficacia predictiva. La toxicología computacional es pues una subdisciplina de la toxicología que tiene como objetivo utilizar las matemáticas, la estadística, el modelado químico y las herramientas informáticas para predecir los efectos tóxicos de las sustancias químicas en la salud humana y/o el medio ambiente, y adicionalmente comprender mejor los mecanismos por los que un producto químico determinado induce daño. En esta revisión resumimos el estado del arte de los diferentes métodos existentes en materia de toxicología computacional, citamos las bases de datos y programas más adecuados para la generación de predicciones robustas y fiables, y se discuten sus limitaciones y el grado de aceptación en el ámbito normativo.

Palabras clave: toxicología computacional, REACH, QSAR, extrapolación, acoplamiento molecular, cribado virtual.

Abstract: Computational methods in predictive toxicology: application to the reduction of animal tests in the context of the EU REACH regulation. Molecular modeling and chemoinformatics have been used for decades for the selection and optimization of new compounds with therapeutic properties. The application of these techniques in predictive toxicology is more recent, and they are experiencing an increasingly interest because of the new legal requirements imposed by the EU REACH regulation. Indeed, a large amount of animal testing is needed under REACH to demonstrate the safety of new chemical entities subjected to registration, and these assays can be significantly reduced by using alternative *in vitro* and *in silico* methods, provided they meet specific conditions to ensure their quality and predictive power. Computational toxicology is as a subdiscipline of toxicology that aims to use mathematics, statistics, chemistry and computer modeling tools to predict the toxic effects of chemicals on human health and/or environment. Additionally, computation studies can help also to better understand the mechanisms by which a given chemical induces harm. In this review we summarize the state of art of the main *in silico* methods, the

toxicological databases and computer programs more suitable for the generation of robust and reliable predictions will be listed, and the limitations and acceptability of computational toxicology will be discussed in the context of the UE regulation.

Key words: computational toxicology, REACH, QSAR, read-across, docking, virtual screening.

Introducción

El Reglamento REACH

El reglamento de ámbito comunitario europeo 1907/2006 para el Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (abreviadamente “REACH”, del inglés Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), fue aprobado el 18 de diciembre de 2006 y entró en vigor el 1 de junio de 2007 [1], siendo su principal objetivo la protección de la salud humana y el medio ambiente. Para alcanzar dicho objetivo REACH regula tanto la producción como el uso de sustancias químicas cuando son producidas/importadas en/a Europa en una cantidad superior a una tonelada al año. Según este reglamento, se exige a fabricantes e importadores de sustancias químicas de la Unión Europea (UE) que registren dichas sustancias y comuniquen la información necesaria para garantizar su uso seguro (como tales, en mezclas o como parte de la composición de artículos), remitiendo un expediente de registro a la Agencia Europea de Productos Químicos (European Chemicals Agency, ECHA, www.echa.europa.eu/). El grado de información requerida depende del nivel de preocupación por la sustancia, siendo más completa por ejemplo para productos carcinógenos, mutágenos y tóxicos para la reproducción (CMR) o para sustancias altamente tóxicas para los organismos acuáticos. Asimismo, los productores de artículos, distribuidores y usuarios intermedios deben ser rigurosos en la identificación de estas sustancias, y actualizar y comunicar la información de las mismas tras el registro.

El reglamento REACH ha supuesto una revolución en el mundo de la regulación de compuestos químicos, por primera vez la industria debe asumir el control del riesgo potencial que comportan los productos que genera y su potencial impacto tanto sobre la salud humana como sobre el ecosistema. Continuar en el mercado exige adoptar las nuevas obligaciones impuestas por REACH, ya que no se pueden fabricar o importar sustancias que no hayan sido previamente registradas y autorizadas por la ECHA, ni tampoco utilizarlas para usos distintos de los registrados. REACH constituye el paradigma de un cambio internacional hacia un uso responsable de los productos químicos, y de hecho otros países están estudiando/adoptando legislaciones similares [2].

* e-mail: rgozalbes@protoqsar.com

Pese a su importancia e impacto positivo, el reglamento REACH también suscita fuertes críticas, especialmente por parte de los industriales que deben adoptar esta legislación. Los puntos objeto de controversia son fundamentalmente dos:

i) Los costes del proceso de registro son muy elevados, debido al alto grado de trabajo experimental y administrativo requerido. Estos costes inciden directamente en la competitividad de las empresas que deben aplicar el reglamento, siendo ésta una cuestión especialmente sensible en un momento de crisis económica mundial como el actual. Las pequeñas y medianas empresas están particularmente expuestas a este riesgo, hasta el punto de que en algunos casos pueden verse en el impedimento de continuar produciendo algunos de sus productos.

ii) A nivel social se plantea además el problema ético de la enorme cantidad de ensayos con animales necesarios para cumplir con los requisitos de información demandados [3]. Se calcula que en la UE se practican anualmente experimentos con alrededor de doce millones de animales vertebrados con distintos fines (científicos, toxicológicos, regulatorios) [4]. Las estimaciones sobre el gran incremento en el número de dichos experimentos que REACH implica para la evaluación de riesgos han alertado y movilizado así a múltiples organizaciones de defensa del bienestar animal y a amplios sectores sociales.

Así pues, la necesidad de métodos alternativos para reducir o sustituir la experimentación animal es más fuerte que nunca. De hecho, el uso de dichos métodos en lugar de las pruebas con animales es claramente estimulado por la propia reglamentación REACH, que en su texto establece que “el máximo esfuerzo debe realizarse para la reducción de los ensayos de productos químicos en animales, que deben realizarse exclusivamente como la última opción, cuando no hay otra manera científicamente fiable de demostrar el impacto de dichos productos en el ser humano o el ecosistema”. Este estímulo institucional de los métodos alternativos no es nuevo, y por ejemplo la Comisión Europea ya lanzó en 1991 el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, European Centre for the Validation of Alternative Methods), con los objetivos de validar técnicas que reduzcan, refinen o reemplacen a los ensayos en animales de productos químicos, biológicos o vacunas, y promover el desarrollo y diseminación de los métodos alternativos, su aplicación a nivel industrial y su aceptación por las entidades reguladoras. Este centro sigue vigente, desde 2011 bajo el nombre de “European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing” (EURL-ECVAM, http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam).

Toxicología computacional

Actualmente, el potencial tóxico de un gran número de sustancias químicas industriales -incluyendo productos farmacéuticos, cosméticos, pesticidas y otros productos químicos sintéticos o semi-sintéticos- se determina mediante el uso de modelos animales estándar, siendo estos estudios requeridos para su aprobación como productos registrados que se pueden lanzar al mercado. Existen diversos métodos alternativos para la sustitución de los ensayos con animales, como las técnicas *in vitro* (que se sirven de porciones de tejidos, órganos perfundidos y cultivos celulares o subcelulares), o el uso de organismos inferiores como bacterias, algas u hongos [5]. Entre dichas alternativas se encuentran también los métodos computacionales o “*in silico*”, que permiten la simulación de mecanismos de acción y la predicción de valores de toxicidad humana o medioambiental mediante el uso de modelos computacionales: es la llamada Toxicología Computacional. Los métodos computacionales se han aprovechado de tres avances

tecnológicos significativos: la disponibilidad creciente de información química y biológica (por ejemplo, a partir de microarrays o de experimentos de cribado de alto rendimiento *in vitro* -high throughput screening, HTS-), el incremento de la potencia de cálculo para analizar informáticamente estos datos, y el desarrollo de métodos bioestadísticos novedosos. Los antecesores de la toxicología computacional son la química informática (“chemoinformatics”) y el modelado molecular, disciplinas en la interfaz entre la química, la biología y la informática que han sido utilizadas durante años en el mundo del descubrimiento y/o diseño de fármacos (“drug discovery”)[6].

Los experimentos *in vivo* requieren mucho tiempo para su preparación y ejecución, y son costosos y éticamente cuestionables. Frente a ellos, los modelos computacionales tienen la capacidad de predecir las propiedades físico-químicas o biológicas de compuestos sin tener que llevar a cabo necesariamente su síntesis química en laboratorio. El uso de los enfoques *in silico* representa pues un ahorro muy significativo de tiempo, recursos y dinero [7], y se caracteriza asimismo por la aplicabilidad de los modelos resultantes de forma fácil e inmediata a nuevas estructuras. A nivel de la industria farmacéutica, es muy frecuente el cribado virtual de grandes colecciones de estructuras (“virtual screening”), que es típicamente un proceso de alto rendimiento a bajo costo que proporciona una indicación rápida de la eficacia y los riesgos potenciales de compuestos, facilitando así su priorización: como no se requieren compuestos físicos estos estudios se pueden ejecutar en las primeras etapas del descubrimiento para seleccionar los productos con mejores propiedades y menor toxicidad [7,8]. Además, las herramientas computacionales también pueden ayudar en algunos casos a proporcionar una comprensión mecanística de estas predicciones, por ejemplo para explicar por qué se prevé que un compuesto muestre cierto tipo de toxicidad.

Existen diversas técnicas de toxicología computacional, y el uso de una u otra depende del grado de complejidad del tipo de toxicidad objeto de estudio y de la información de partida de la que disponemos. La herramienta más potente y eficaz es el desarrollo y aplicación de modelos matemáticos de predicción QSAR, y por tanto los veremos con más detalle. Otros enfoques predictivos reseñables son el acoplamiento molecular (“docking”) para analizar las interacciones de compuestos químicos con receptores biológicos, el estudio sistemático de las relaciones estructura-actividad basado en el conocimiento y la experiencia previos (“knowledge-based SAR systems”), la extrapolación de propiedades por similitud estructural (read-across), y el estudio de la farmacocinética basado en la fisiología (PBPK).

Modelado por QSAR/QSTR

Una de las primeras aplicaciones de la química computacional fue la predicción de la actividad biológica basada en la estructura química: los modelos QSAR (del inglés “Quantitative Structure-Activity Relationships”). Esta técnica consiste en la construcción de un modelo matemático relacionando por medio de herramientas estadísticas la estructura química de una serie de moléculas -caracterizadas previamente por una serie de descriptores moleculares numéricos- con una propiedad fisicoquímica o actividad biológica. Una vez se ha establecido dicha correlación, la misma puede usarse para predecir la propiedad/actividad en nuevas moléculas cuya estructura química sea conocida. Debido al gran coste y tiempo necesarios para la investigación y desarrollo de medicamentos, los modelos QSAR se vienen utilizando desde hace décadas en “drug discovery”, en donde forman parte del protocolo estándar para el

descubrimiento de fármacos y su posterior optimización, referida tanto a los efectos terapéuticos [7] como tóxicos [8,9]. Los modelos QSAR se usan también para proporcionar predicciones de las propiedades farmacocinéticas (ADME) en etapas tempranas del proceso [10-14]. Cuando la actividad biológica estudiada es un dato de toxicidad, sería más propio hablar de modelos QSTR (“Quantitative Structure-Toxicity Relationships”), aunque esta nomenclatura no se ha generalizado completamente y muchos autores siguen hablando globalmente de QSAR.

La utilización de los QSARs/QSTRs presenta varias ventajas frente a otras metodologías, entre las que destaca el hecho de que, una vez se ha desarrollado un modelo, la predicción de toxicidad de un compuesto se puede hacer a partir únicamente del conocimiento de su estructura química, así como el hecho de que los modelos pueden automatizarse fácilmente, proporcionando así un medio extremadamente rápido para evaluar un alto número de estructuras químicas. Hay un gran número de usos potenciales de las QSTR en la industria para la predicción de la toxicidad [7-9]. Por ejemplo en la industria farmacéutica permiten aumentar la probabilidad de identificación temprana de toxicidad de los candidatos a fármacos mucho antes de invertir cantidades enormes de tiempo y recursos en su desarrollo, a fin de reducir las tasas de abandono del desarrollo de fármacos [15,16]. Además, la predicción de la toxicidad se puede aplicar a las evaluaciones de riesgo ambiental para los contaminantes comunes. No obstante, su uso puede verse afectado por ciertas limitaciones, entre las que cabe destacar la falta de datos de toxicidad adecuados disponibles en ciertos casos, y la inadecuación de modelos excesivamente simplistas para la predicción de valores toxicológicos dependientes de mecanismos de acción complejos o múltiples. Además, a diferencia de los animales o las pruebas *in vitro*, hay que tener en cuenta que los QSTRs deben revisarse periódicamente y refinarse a medida que se disponga de nuevos datos, de modo que los modelos validados en un momento dado tiene que re-validarse cada cierto tiempo para no resultar obsoletos.

Modelos QSTR en la literatura científica

Un gran número de modelos QSTR han sido desarrollados para estimar diferentes parámetros toxicológicos de los productos químicos -tanto relacionados con los efectos en la salud humana como con el impacto ambiental- empleando diferentes metodologías. En términos generales, los modelos publicados se pueden clasificar en función del tipo de toxicidad que intentan predecir:

- i) Toxicidad sistémica en humanos: fundamentalmente predicciones de carcinogénesis, mutagénesis, toxicidad reproductiva y toxicidad aguda. Además, hay un interés considerable en la predicción de parámetros farmacocinéticos que pueden influir en la biodisponibilidad de los compuestos, particularmente de fármacos.
- ii) Toxicidad en humanos a nivel local: predicción de toxicidad sobre la piel, sensibilización respiratoria, irritación cutánea y ocular, fototoxicidad.
- iii) Distribución ambiental: se refiere a la dispersión y destino final de compuestos químicos con efectos tóxicos en el ambiente, que se puede modelar en términos de su persistencia (es decir, la biodegradación, hidrólisis, etc.), distribución y bioacumulación.
- iv) Ecotoxicidad: predicciones de efectos tóxicos en plantas, organismos acuáticos y terrestres (invertebrados y vertebrados) y pájaros.

Los primeros modelos QSTR se basaron en la premisa de que la toxicidad podría ser correlacionada con ciertas características

moleculares de los agentes químicos que la causan [17]. Estos primeros modelos fueron limitados por el número de parámetros que podían ser modelados y tendían a no ser muy predictivos, especialmente para las toxicidades complejas que se pueden producir a través de diferentes mecanismos de acción. Actualmente la lista de estudios predictivos publicados es muy amplia, de entre los que destacaremos modelos QSTR para predecir los efectos en el hígado de los fármacos candidatos [18], toxicidad cardíaca [19,20], carcinogenicidad [21] o mutagenicidad [22].

QSTRs en las normativas regulatorias internacionales

Diversos organismos internacionales permiten la utilización de los métodos computacionales (en general, y sobre todo los QSARs/QSTRs en particular) con distintos fines relacionados con la regulación de las entidades químicas nuevas y existentes. El uso de QSTRs para ayudar en la regulación de productos químicos se divide en tres grandes áreas: la clasificación y el etiquetado, evaluación de riesgos y el establecimiento de prioridades. Históricamente, fueron inicialmente las agencias reguladoras en América del Norte las que tomaron la delantera en el desarrollo y empleo de estos métodos para la reglamentación de nuevas sustancias. Así por ejemplo, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, EPA, www.epa.gov) reglamentó la utilización de modelos QSAR en el proceso de notificación previa a la fabricación de nuevos productos químicos, sobre todo cuando no había datos previos de toxicidad disponibles [23]. Otro ejemplo fue la Ley Canadiense de Protección del Medio Ambiente (Canadian Environmental Protection Act, CEPA), según la cual unas 23.000 sustancias de una lista de productos de uso doméstico debían cribarse y agruparse por categorías según sus valores de persistencia, bioacumulación y toxicidad inherentes [23]. Dada la falta de información experimental para una gran mayoría de estas sustancias, las ventajas e inconvenientes del uso de QSTR fueron analizados [23,24]. Más recientemente, las agencias reguladoras de Estados Unidos como la “Food and Drug Administration” (FDA, www.fda.gov) han invertido tiempo y recursos en la evaluación de la utilidad de los métodos computacionales orientados a la detección de señales de riesgo toxicológico, incluyendo los QSTRs [25, 26]. En la FDA, estos esfuerzos se concretaron en forma de modelos basados en parámetros toxicológicos que no pueden ser probados en seres humanos, incluyendo los QSTRs de toxicidad genética, toxicidad reproductiva y carcinogenicidad [27-30].

A pesar del uso relativamente limitado entonces en Europa, la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Dinamarca (<http://eng.mst.dk/>) utilizó una variedad de métodos QSAR para establecer prioridades entre unos aproximadamente 166.000 productos químicos según sus efectos potenciales en la salud humana [23]. Finalmente, el incentivo para un mayor uso de estos métodos ha sido la reglamentación comunitaria, inicialmente impulsada por la publicación por la Comisión Europea del Libro Blanco que establecía una estrategia para una futura política sobre productos químicos [31] que finalmente se convertiría en la reglamentación REACH [1]. En definitiva, podemos afirmar que las políticas gubernamentales, tanto en la UE como en América del Norte, han animado -y en algunos casos ordenado en su legislación- el uso de técnicas computacionales para predecir la toxicidad. De entre ellas, los modelos QSTRs son los que presentan una mayor validez desde el punto de vista regulatorio.

Una cuestión fundamental que se plantea a nivel legal es la de la validez de los modelos QSTR a la hora de considerarlos para tomar una decisión de autorización de un compuesto químico. Lógicamente, la decisión sobre la aplicación de los QSTRs para

sustancias cuyos efectos aún se desconocen es sostenible sólo cuando un modelo tiene una base sólida y no es el resultado de especulaciones teóricas. No obstante, varios estudios retrospectivos han demostrado la falta de calidad y capacidad predictiva de algunos modelos QSTR desarrollados previamente, abriendo pues el debate sobre la pertinencia de su utilización convencional [32,33]. En los últimos años se ha iniciado pues un replanteamiento crítico e imparcial para evaluar la fiabilidad de los resultados de los modelos computacionales. De acuerdo con la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, www.oecd.org/) se pueden definir una serie de reglas generales que ayuden a determinar si un modelo QSTR es apropiado para uso regulatorio [34]. Se conocen como “reglas de Setúbal” porque se derivaron en la reunión “International Workshop on the Regulatory Acceptance of QSARs for Human Health and Environment Endpoints”, que tuvo lugar en dicha ciudad portuguesa en marzo de 2002. Este evento fue organizado por las dos organizaciones profesionales más representativas de la industria química, el Consejo Europeo de la Industria Química (CEFIC, acrónimo de su nombre original en francés, *Conseil Européen des Fédérations de l'Industrie Chimique*) y el Consejo Internacional de Asociaciones Químicas (*International Council of Chemical Associations, ICCA*). Y las reglas enunciadas son las siguientes:

- i) Los modelos deben orientarse a parámetros toxicológicos (“endpoints”) bien definidos y de clara importancia regulatoria,
- ii) deben tomar la forma de un algoritmo inequívoco,
- iii) su dominio de aplicabilidad tiene que estar claramente definido y justificado,
- iv) deben cumplir con las medidas reconocidas científicamente para demostrar la bondad de su ajuste, robustez y capacidad de predicción,
- v) en la medida de lo posible, es conveniente que aporten una posible interpretación sobre mecanismos de acción toxicológica de los compuestos estudiados [34].

Estas reglas fueron definitivamente adoptadas por todos los países miembros de la OCDE en el “37th Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology”, en noviembre de 2004. La Unión Europea las ha incluido también en el anexo XI del Reglamento REACH [1] y en el anexo IV de las Normas para Productos Biocidas [35], prácticamente sin modificaciones.

Una prueba de este cambio hacia un uso más exigente de las técnicas QSTR es que incluso muchos de los mejores modelos desarrollados para el descubrimiento de fármacos podrían no cumplir con estas condiciones (es decir, teóricamente podrían no ser aceptados desde un punto de vista reglamentario). Esto es lógico, porque de hecho el objetivo principal del descubrimiento de fármacos es el de derivar modelos predictivos, relegando la transparencia y la adecuación de los resultados a un papel secundario, y por otra parte su validación se suele basar en datos internos que pueden no estar disponibles a efectos reguladores de REACH.

Fuentes de datos toxicológicos

Un factor absolutamente clave para la eficacia predictiva de los modelos computacionales es la cantidad y calidad de los datos a partir de los que se construyen. Estos datos pueden provenir de ensayos *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, ensayos de carcinogenicidad en animales vs. ensayos de mutación bacteriana de Ames), pero en este caso hay que tener en cuenta su interrelación, pues generalmente el objetivo final es predecir los efectos *in vivo* en humanos. Una de las mayores

limitaciones a las que se enfrentan los especialistas para desarrollar modelos QSTR eficientes es la falta de suficientes datos toxicológicos de calidad, indispensables para su desarrollo y validación. Hasta ahora los datos disponibles han sido muy limitados en términos de espacio químico y biológico para la gran mayoría de parámetros toxicológicos. La necesidad de más datos para aumentar la cobertura de los modelos no debe ser vista como una necesidad de realización de más ensayos en animales, sino de la aplicación de un mayor esfuerzo para utilizar los datos existentes (por ejemplo, en bases de datos corporativas o reglamentarias). En el pasado se alzaron voces para compilar este tipo de bases [23], y hay varios ejemplos de publicación de datos propietarios para el desarrollo de modelos *in silico*. Entre ellos cabe citar el acuerdo de investigación y desarrollo en colaboración (CRADA, del inglés “*Cooperative Research and Development Agreement*”) entre la FDA estadounidense y la compañía Multicase, Inc. Esta colaboración, que implicó la liberación de datos reglamentarios (aunque las estructuras químicas no se pusieron a disposición del público) y el codesarrollo de un programa de evaluación automatizada de estructuras químicas, supuso una gran mejora en la cobertura y la capacidad de predicción de los modelos de carcinogenicidad [36]. Los problemas de sensibilidad comercial y la confidencialidad deben ser tenidos en cuenta en la recogida y el uso de estos datos.

Más recientemente, los avances en técnicas de alto rendimiento (HTS) y metodologías “ómicas” han permitido la generación de datos multidimensionales de toxicidad en grandes bibliotecas químicas, representando una vía interesante para futuros desarrollos en toxicología computacional. Actualmente hay una mayor cantidad de recursos en forma de datos públicos y privados disponibles para el desarrollo de modelos de toxicidad, entre los que cabría resaltar algunos casos de integración de datos aportados por la colaboración entre investigadores en proyectos como el DSSTox (de “*Distributed Structure-Searchable Toxicity*”), la CPDB (de “*Carcinogenic Potency Database*”, con informes de tests de cáncer en animales para más de 1,500 productos químicos, que son accesibles gratuitamente vía la web de la Toxicology Data Network, TOXNET®, <http://toxnet.nlm.nih.gov>), o PubChem (repositorio público de estructuras químicas y propiedades biológicas asociadas, la mayor parte de los datos provenientes del centro de cribado del programa de librerías moleculares del NIH, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) [37].

Un problema que plantea la existencia de diferentes fuentes de información es la comparación de datos entre ellas y su validez. Antes de iniciar el modelado, el especialista tiene que garantizar la calidad de los conjuntos de datos, que en muchos casos provienen de fuentes diversas y se presentan en formatos diferentes, y planificar procedimientos de normalización [38]. A pesar de los esfuerzos de una serie de organizaciones internacionales que intentan armonizar dicha información, ésta sigue siendo una necesidad crítica. En la Tabla 1 se listan algunos recursos electrónicos útiles que contienen datos adecuados para la construcción de modelos de toxicología, siendo todos ellos públicos y accesibles gratuitamente.

Programas especializados para el desarrollo de QSTRs

Las etapas de desarrollo de un modelo QSAR son siempre similares:

- i) la base de datos inicial con información estructural y biológica precisa de cada uno de los compuestos que la componen se descompone aleatoriamente en dos grupos, “entrenamiento” y “validación”. El primero servirá para desarrollar el modelo, y el segundo para verificar su eficacia predictiva.

Tabla 1. Selección de bases públicas de datos toxicológicos disponibles gratuitamente.

Base de datos	Breve descripción	Página web de acceso
ACToR (Aggregated Computational Toxicology Resource)	Recopilación por la "US EPA Computational Toxicology Research Program", a partir de fuentes de información pública. Aporta datos toxicológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sobre unos 500.000 productos químicos en el medio ambiente, sobre todo pesticidas y contaminantes terrestres y acuáticos.	www.epa.gov/actor
CCRIS (Chemical Carcinogenesis Research Information System)	Resultados de ensayos de carcinogenicidad y mutagenicidad para unos 8.000 compuestos químicos. Esta base fue desarrollada por el National Cancer Institute (NCI), a partir fundamentalmente de datos derivados de estudios citados en revistas científicas e informes de la propia NCI, y fue revisada por expertos en carcinogénesis y mutagénesis. Esta base no se actualiza desde 2011.	http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/ccris.htm
CPDB (Carcinogenic Potency Database)	Resultados de tests de carcinogenicidad a largo plazo en animales (ratones, ratas, perros, primates) para más de 1.500 compuestos químicos. No actualizada desde 2005.	http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/
DART (Developmental and Reproductive Toxicology Database)	Recopilación de la National Library of Medicine (NLM) que aporta información específica en toxicología reproductiva y del desarrollo publicada desde 1965.	http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/dartfs.html
DSSTox (Distributed Structure-Searchable Toxicity Database)	Iniciativa de la EPA cuya principal característica es que propone un conjunto descentralizado de bases de datos de toxicidad navegables por estructura y que se pueden telecargar en formatos estándar como SDF.	http://www.epa.gov/nccet/dsstox/
GENE-TOX (Genetic Toxicology Data Bank)	Datos de mutagenicidad para unos 3.000 productos químicos de la EPA. Estos datos son revisados por un panel de expertos a partir de la literatura científica. Esta base no se ha actualizado desde 1998.	http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/genctox.htm
PAN (Pesticide Action Network) Database	Información sobre pesticidas a partir de muchas fuentes diversas, incluyendo toxicidad humana (aguda y crónica), ecotoxicidad e información regulatoria para unos 6.400 ingredientes activos de pesticidas y sus productos de transformación.	http://www.pesticideinfo.org/
RepDose (Repeated Dose Toxicity)	Base financiada por la CEFIC, con información de toxicidad aguda y crónica de unos 1.200 compuestos químicos en ratones, ratas y perros. Incluye valores en órganos concretos, y los estudios de cuyos datos se sirve están ordenados por su credibilidad, según su grado de cumplimiento de las reglas de la OCDE.	http://fraunhofer-rcpdose.de/
TETRATOX	Colección del Instituto de Agricultura de la Universidad de Tennessee (US), compuesta por datos de toxicidad acuática de más de 2.400 compuestos orgánicos de origen industrial usando el ciliado <i>Tetrahymena pyriformis</i> .	http://www.vet.utk.edu/TETRATOX/index.php
ToxRefDB (Toxicity Reference Database)	Contiene fundamentalmente información de toxicidad crónica-subcrónica y toxicidad reproductiva y del desarrollo de centenares de compuestos químicos, muchos de ellos ingredientes activos de pesticidas y otros productos que afectan al medio ambiente.	http://www.epa.gov/nccet/toxrefdb/

ii) A continuación los compuestos deben ser caracterizados por una serie de descriptores moleculares numéricos, de forma que cada una de las moléculas sea inequívocamente representada por los mismos.

iii) Aplicación de las técnicas estadísticas apropiadas al grupo de compuestos de entrenamiento para la generación de los modelos.

iv) Validación de los modelos mediante la evaluación de los parámetros estadísticos estandarizados obtenidos, y comprobación de la calidad de ajuste entre valores experimentales y predichos para el grupo de validación.

Los programas especializados necesarios en QSAR deben pues referirse tanto al cálculo de los descriptores numéricos necesarios para caracterizar las moléculas como a las técnicas estadísticas para el desarrollo de los modelos matemáticos. Los tipos de descriptores pueden ser muy variados, desde sencillas cuentas de características estructurales simples (p. ej. número de heteroátomos, de anillos aromáticos, etc.) o de determinados fragmentos o subestructuras (p. ej. número de grupos carbonilo, carboxilo, etc.), a propiedades fisicoquímicas (peso molecular, LogP, solubilidad, etc.), índices topológicos (que tienen en cuenta exclusivamente la estructura plana o grafo molecular) o índices tridimensionales que dependen de la conformación estructural. Existen cientos de ellos, y no hay una definición clara de cuáles son los mejores, pues codifican información diferente y los estudios comparativos realizados proveen resultados contradictorios [39]. No obstante, podemos considerar que los descriptores más simples son probablemente más prácticos porque permiten una rapidez de computación superior todo y manteniendo una capacidad predictiva equiparable, lo cual resulta de gran utilidad cuando se tienen que cribar posteriormente grandes bases de datos de miles de estructuras químicas [40]. En cuanto al

número de algoritmos y técnicas estadísticas útiles para llevar a cabo el modelado QSAR también es muy amplio (por ejemplo, regresión lineal, clustering, métodos kernel, análisis discriminante...), y su selección depende de la naturaleza del conjunto de datos con los que se trabaja, y el tipo de predicción que se desea extraer (clasificación binaria -tipo "activo/inactivo"-, estimación cuantitativa de toxicidad -por ejemplo de DL₅₀-, etc) [41,42].

Existe un panel muy amplio de programas especializados, tanto para el cálculo de descriptores como para la aplicación de métodos estadísticos, o bien paquetes que integran ambos aspectos del desarrollo de modelos QSAR [43]. Un aspecto importante a reseñar es que buena parte de estas herramientas están disponibles gratuitamente, y en un buen número de casos a través de páginas web de acceso público [44]. La Tabla 2 muestra una selección de programas y aplicaciones gratuitos para el desarrollo de modelos QSAR o la aplicación de modelos previamente desarrollados y validados.

Otras técnicas de química computacional

Acoplamiento molecular ("docking")

Existen distintos receptores intracelulares conocidos por su importancia en mediar en respuestas toxicológicas. En muchos casos, la toxicidad de los compuestos químicos se origina en su afinidad de unión hacia uno de estos receptores biológicos específicos, unión que resulta en una disfunción de procesos como biosíntesis, transducción de señales, transporte, metabolismo... Ejemplos de este tipo de receptores pueden ser el receptor glucocorticoide (cuya inhibición puede causar daños en el sistema inmune y diversas funciones corporales) o el gen hERG (cuya inhibición produce alteración cardíaca y arritmias).

Tabla 2. Selección de software gratuito para la generación y/o aplicación de modelos QSAR/QSTR.

Software	Breve descripción	Página web
CAESAR-VEGA	CAESAR fue un Proyecto financiado por la UE con el objetivo específico de desarrollar modelos QSAR adaptados a la legislación REACH. Cinco modelos predictivos fueron implementados para cinco propiedades de alta relevancia en REACH: factor de bioconcentración, sensibilización cutánea, carcinogenicidad, mutagenicidad, toxicidad del desarrollo. Dichos modelos fueron desarrollados según los principios OCDE, y se aplicaron diversas técnicas estadísticas y el uso de sets externos de validación para certificar su predictibilidad. Actualmente las herramientas CAESAR se han implementado en la plataforma VEGA.	http://www.caesar-project.eu/ http://www.vega-qsar.eu/
ChemProp	Consta de varios módulos, dependiendo de los métodos de cálculo que se desee utilizar. Las técnicas implementadas se basan fundamentalmente en la estructura química en 2D (fragmentos, índices topológicos, etc.). Se incorporan varios modelos a partir de bases de datos internas. Los modelos se acompañan de herramientas para caracterizar el dominio de aplicabilidad y proveer estimaciones de incertidumbre.	http://www.ufz.de/index.php?en=6738
CORAL-SEA	Interfaz simple, posibilidad de generar modelos de regresión o clasificación binaria, tiene el inconveniente de ser excesivamente lento para sets de compuestos excesivamente grandes (máximo análisis posible de 5,000 estructuras).	http://www.insilico.eu/coral/CORALSEA.html
QSAR-Toolbox	Es el programa oficial de la OCDE, y en consecuencia facilita al usuario el cumplimiento de las normas REACH. Se caracteriza sobre todo por la posibilidad de agrupar sustancias químicas en función de su similitud estructural, permitiendo el uso de datos experimentales existentes para cubrir vacíos de información.	http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm http://www.qsartoolbox.org
Lazar	Interfaz web a través de la cual se pueden generar diversas predicciones de toxicidad a partir de una estructura química. Incluye un informe racional sobre dichas predicciones, estimaciones del dominio de aplicabilidad y resultados de validación.	http://lazar.in-silico.ch/predict
RmSquare	Es una herramienta web para estimar la capacidad predictiva de un modelo a partir de datos sobre los valores experimentales y predichos en un grupo de estructuras reservadas para la validación.	http://aptsoftware.co.in/rmsquare/
TEST	Programa desarrollado por la EPA para estimar la toxicidad aguda a partir únicamente de la estructura de compuestos químicos. Se sirve de distintas técnicas QSAR, y consta de modelos de predicción variados: LC ₅₀ en <i>Fathead minnow</i> o <i>Daphnia magna</i> , DL ₅₀ oral en ratas, factor de bioconcentración, test de mutagenicidad de Ames, toxicidad del desarrollo, etc. También contiene modelos de predicción de diversas propiedades físicas (punto de ebullición, viscosidad, densidad, solubilidad en agua, punto de fusión, etc.)	http://www.cpa.gov/nrmrl/std/qsar/qsar.html#TEST
Tox-Comp	Sistema modular para la evaluación temprana de la cardiotoxicidad de nuevas entidades químicas. Esta plataforma consiste en varios elementos interconectados, entre los que destaca un calculador del potencial de inhibición de hERG.	http://tox-comp.net/
Toxtree	Aplicación "open-source" desarrollada por la compañía Ideacon Ltd. por encargo del Joint Research Center (JRC) de la Comisión Europea. Es una herramienta que agrupa las estructuras químicas por categorías y predice varios tipos de efectos tóxicos mediante la aplicación de árboles de decisión. Entre los modelos disponibles: irritación cutánea, irritación ocular, mutagenicidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (test de Ames), carcinogenicidad, biodegradación y persistencia, unión a DNA, unión a proteínas.	http://toxtree.sourceforge.net/
Virtual Computational Chemistry Laboratory	Acceso gratuito a través de la web a un conjunto de programas QSAR variados, que van desde el cálculo de descriptores moleculares numéricos (PCLIENT o E-DRAGON), herramientas estadísticas (ASNN, PNN o PLS) o modelos QSAR previamente desarrollados y listos para su aplicación (ALOGPS, software de referencia para la predicción de lipofiliidad y solubilidad acuosa de moléculas).	http://www.vcclab.org/
VirtualToxLab	Herramienta "on line" para la predicción del potencial toxicológico en 16 proteínas biológicas conocidas por su capacidad de desencadenar efectos adversos, usando una combinación de métodos computacionales (docking y QSAR)	http://www.chemic.unibas.ch/~vbc/molmod/virtualtox/index.html

En ese contexto, los estudios de acoplamiento molecular ("docking") pueden ser de una gran ayuda predictiva, pues permiten determinar computacionalmente la conformación óptima y la orientación preferidas por una molécula para unirse a uno de esos receptores y generar un complejo estable en el que la energía libre del sistema completo se ve minimizada. Los estudios de docking consisten generalmente en cuatro partes:

- i) en primer lugar, las estructuras de los ligandos potenciales han de ser diseñadas *in silico* y minimizadas.
- ii) un muestreo conformacional es llevado a cabo, de manera a tener un número predeterminado de conformaciones posibles de cada ligando,
- iii) los ligandos deben centrarse en el bolsillo ("pocket") de unión a su receptor, y diferentes movimientos de translación y rotación de las distintas conformaciones son evaluadas energéticamente, y
- iv) un "score" es asignado para cada una de ellas, con el fin de poder ordenar todas las hipótesis posibles en función de las interacciones establecidas y su energía [45].

En la práctica industrial lo habitual es que esta técnica se utilice como un cribado computacional para series con centenares o incluso miles de compuestos ("virtual screening").

Existe un buen número de programas de docking, de entre los que destacan DOCK -que fue el primer programa de docking descrito- (<http://dock.compbio.ucsf.edu/>) [46] y AutoDock -que es probablemente el programa de docking más citado- (<http://autodock.scripps.edu/>) [47]. Otra herramienta destacable es el VirtualToxLab, una plataforma diseñada en el "Biographics

Laboratory 3R", un organismo suizo de investigación para el reemplazo de ensayos con animales por métodos computacionales (<http://www.biograf.ch/>), que ha diseñado una estrategia combinando docking y QSAR para el estudio de 16 receptores cuya inhibición puede inducir efectos adversos [48].

Extrapolación por similitud estructural ("read-across")

La extrapolación de los datos de riesgo es un método bien conocido para predecir el perfil de peligrosidad de una sustancia vinculándolo a compuestos estructuralmente similares para los que se poseen datos experimentales sobre un efecto determinado [6,49]. Esta metodología se basa en la asunción bien establecida entre los químicos farmacéuticos de que características estructurales comunes conducen a propiedades similares [50]. Una predicción por extrapolación puede derivarse a partir de una propiedad de un compuesto o conjunto de compuestos estructuralmente similar(es) al que queremos predecir: por ejemplo, si se sabe de una determinada sustancia que es cancerígena, puede considerarse que otra muy similar estructuralmente tiene una alta probabilidad de serlo también. La predicción será tanto más fiable cuanto mayor sea el número de estructuras químicas similares agrupadas en una categoría. De modo análogo al QSAR/QSTR, uno de los criterios para que una predicción por read-across sea válida es que el producto químico candidato esté dentro del ámbito de aplicabilidad del modelo, es decir, dentro de los rangos de los descriptores y/o clases de sustancias químicas asociadas con el mecanismo propuesto.

A la diferencia del QSAR/QSTR, la metodología read-across es fundamentalmente cualitativa, y su piedra angular es la correcta identificación del producto químico de partida sobre el que se realiza

la medida de similitud. A este respecto, otros aspectos deben ser considerados además de la similitud química, para que el enfoque sea significativo es importante contar también con un modo común de acción y vías metabólicas similares. El read-across presenta la ventaja de que es una metodología transparente y se puede entender fácilmente, lo que favorece su aceptabilidad por los usuarios finales y las entidades reguladoras. El reglamento REACH permite de hecho el uso de la extrapolación de los datos toxicológicos de un producto químico para predecir la toxicidad de otro.

Un programa útil para la generación de predicciones por read-across es la QSAR-Toolbox, una herramienta disponible públicamente que permite la selección de análogos, la construcción de categorías según bases mecanicistas, inferir tendencias y realizar análisis de extrapolación/predicciones. Es una herramienta que forma parte del Proyecto QSAR de la OCDE y se co-desarrolló con la ECHA (www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdquantitativestructure-activityrelationshipsprojectqsars.htm), con el objetivo general de aumentar la aceptación reglamentaria de las predicciones *in silico*.

Relaciones estructura-actividad basadas en el conocimiento ("knowledge-based SAR systems")

Este enfoque se asocia con la reactividad de los grupos funcionales de los productos químicos, es decir los grupos que presentan el conjunto de rasgos estéricos y electrónicos de la estructura química que son responsables de la interacción con una diana biológica específica, induciendo así sus consiguientes efectos toxicológicos (grupos "toxicóforos"). Las características típicas de los toxicóforos son la hidrofobicidad, aromaticidad, carácter catiónico o aniónico, y la posibilidad de establecer puentes hidrógeno. El aspecto fundamental de esta metodología es partir de una base de conocimiento humano para establecer un conjunto de reglas codificadas que permitan predecir si un producto químico presenta una determinada toxicidad. Estos sistemas emiten alertas estructurales en las moléculas químicas consultadas cuando se identifican los toxicóforos para los que existe evidencia científica significativa. Las predicciones se apoyan en referencias o citas que se pueden seguir para determinar la relevancia de su idoneidad. El desarrollo de la base de conocimiento o base de reglas requiere obviamente de un análisis cuidadoso de extensas bases de datos, y representa esencialmente un enfoque basado en el consenso. Un inconveniente inherente a este enfoque es que los expertos humanos pueden estar equivocados o incluso inadvertidamente sesgados en la formulación de las reglas [51].

La principal ventaja es que la base de conocimientos utilizada para introducir normas en el sistema está basada en evidencias empíricas, por lo general vinculadas a una comprensión mecanicista de la toxicidad, y en las que se integra el juicio o razonamiento humano [52]. Una desventaja es que una característica subestructural es sólo una parte del conjunto más amplio de características de una molécula, y por tanto las predicciones pueden tender a sobreestimar la toxicidad porque no consideran potenciales características atenuantes o factores moduladores. Otro punto interesante es que en realidad la predicción negativa es inexistente: si no hay alerta estructural con la molécula de consulta, esto simplemente significa que no hay reglas que hayan sido codificadas en el programa para alertar de una toxicidad (porque no hay suficiente representación de la función subestructural en la literatura disponible con el fin de apuntar a ella como una característica de toxicidad).

Un malentendido frecuente es creer que los programas informáticos para los estudios del tipo "knowledge-based SAR systems" se limitan a contener y gestionar una base de datos de información sobre la

toxicidad. Eso no es así, estas aplicaciones no son simples sistemas de gestión de bases de datos, sino programas informáticos de alta complejidad que integran conocimientos y reglas de expertos derivadas del análisis de datos químicos y toxicológicos. Diversos programas informáticos generan alertas estructurales preventivas de la existencia de grupos toxicóforos [53,54], siendo el más popular y usado de ellos Derek Nexus de Lhasa Ltd. (www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm) [55]. La mayor parte de estos programas presentan un aspecto versátil, de manera que tienen una funcionalidad de edición personalizada de reglas para que el usuario pueda derivar las suyas propias en función de sus datos internos.

PBPK

Los efectos adversos y tóxicos de compuestos (contaminantes ambientales, fármacos, etc.) en los seres vivos dependen en buena medida de sus propiedades farmacocinéticas (ADME), es decir de cómo son absorbidos, se distribuyen por todo el organismo, y cómo se metabolizan y son finalmente excretados. El modelado PBPK (del inglés "physiologically-based pharmacokinetic modeling") es una técnica de simulación matemática de la farmacocinética de compuestos para la predicción de sus propiedades ADME, y se usa tanto para la investigación y desarrollo farmacéuticos, como para la evaluación de riesgos en la salud [56,57]. Es una metodología que pretende considerar las diferencias farmacocinéticas entre especies al estimar el riesgo humano a partir de los datos de animales, y las diferencias individuales intra-especie (edad, sexo, raza, etc.) al evaluar el impacto de la variabilidad farmacocinética en los riesgos individuales. En pocas palabras, el modelado PBPK intenta describir la relación entre las medidas externas de dosis aplicada (por ejemplo, cantidad suministrada de alimentos, drogas o fármacos, o bien concentración de contaminantes en el agua o el aire) y las medidas internas de la dosis encontrada (por ejemplo, cantidad metabolizada o concentración en el tejido que muestra la respuesta tóxica), utilizando de la forma más realista posible una descripción de la fisiología y la bioquímica de los animales/humanos [58].

Las aplicaciones en toxicología de los modelos PBPK se han incrementado en los últimos años, incluyendo la predicción de exposición a contaminantes ambientales y sus metabolitos, las concentraciones en órganos particulares de compuestos con potenciales efectos adversos, o el cálculo de las dosis apropiadas a suministrar de medicamentos a partir de la información sobre su mecanismo de acción. La mayor parte de estos modelos han sido desarrollados y validados con datos experimentales provenientes de ensayos con animales y extrapolados posteriormente al ser humano. Dada la tendencia a limitar los ensayos con animales, la información obtenida por esta vía es menor, y por tanto las técnicas *in vitro* están reemplazándolas [59]. Hay un gran interés en la extrapolación de datos de toxicidad *in vitro* con modelos PBPK para calcular las dosis equivalentes humanas para una concentración dada, y diversas publicaciones han dado cuenta de esta extrapolación *in vitro-in vivo* para evaluación del riesgo [60,61]. Aunque los modelos PBPK están diseñados para predecir las concentraciones tisulares o en sangre, se necesitan nuevos modelos de relación dosis-respuesta con base biológica que utilicen las estimaciones de las dosis internas para predecir la respuesta o toxicidad a través de correlaciones estadísticas. Este tipo de estudios ofrece una oportunidad única para incorporar información sobre mecanismos de acción.

En cuanto al software utilizado para este tipo de estudios, la referencia sin duda en este campo es GastroPlus, un paquete de simulación capaz de predecir la absorción, farmacocinética,

farmacodinamia e interacciones fármaco-fármaco para compuestos administrados por distintas vías (oral, ocular, intravenosa, pulmonar) a animales y humanos (<http://www.simulations-plus.com>) [62].

Perspectivas: nanotoxicología predictiva

En los últimos años la utilización de nanomateriales en diferentes sectores industriales está experimentando un incremento espectacular y sus aplicaciones en la vida real son cada vez más diversas. Sin embargo, existe un vacío de conocimiento enorme en la comprensión de los efectos tóxicos de estas nanopartículas, y la preocupación acerca de su seguridad es consiguientemente cada vez mayor. Las nanopartículas poseen propiedades únicas respecto a los productos químicos tradicionales, que se observan en la materia exclusivamente a nivel nanométrico, tales como su mayor superficie con respecto a su volumen, o su mayor capacidad de paso de las membranas biológicas. Estas propiedades físico-químicas ejercen una influencia importante en las interacciones con los sistemas biológicos, sobre todo porque al tener un tamaño comparable al de las macromoléculas los nanomateriales podrían estar involucrados en interacciones no observadas normalmente con los productos químicos tradicionales, y producir efectos en gran parte desconocidos, pero potencialmente tóxicos para las células [63].

Las metodologías computacionales pueden ayudar a entender las características intrínsecas de los nanomateriales y sus mecanismos de acción, pero su desarrollo se ha producido hasta ahora en base a la química clásica, y necesitan adaptarse a los parámetros de los nanomateriales para evaluar cuantitativamente sus riesgos y, en caso necesario, poder proponer soluciones de reemplazo de nanopartículas con efectos tóxicos por otras más seguras. Pueden citarse algunos ejemplos de trabajos predictivos utilizando docking/dinámica molecular para investigar la unión de fullerenos a canales de potasio [64] o la evaluación de la afinidad de fármacos a los nanotubos de carbono en un medio acuoso [65].

Las técnicas computacionales de naturaleza estadística como read-across o QSAR son las que más se han utilizado en nanomateriales. La mayor dificultad que presentan estos estudios es que las estructuras moleculares tienen que ser previamente caracterizadas por descriptores que se correlacionen con las propiedades experimentales, y en el caso de los nanomateriales esto es bastante complicado y no hay un conjunto único de descriptores numéricos adaptados a las partículas nanométricas [66]. El desarrollo y la validación de los modelos computacionales estadísticamente fiables son pues difíciles porque hasta ahora son raros los estudios geométricos, estructurales, físico-químicos y biológicos de los nanomateriales. Pese a ello, el número de modelos "Nano-QSAR" relevantes está creciendo significativamente, y entre ellos cabría destacar:

- i) Varios modelos han tratado la predicción de solubilidad de nanomateriales en distintos solventes, dado que éste es uno de los parámetros más influyentes sobre su comportamiento en el medioambiente. Destacaremos el trabajo de predicción de solubilidad de fullerenos con índices topológicos simples de Petrova *et al.* [67].
- ii) Liu y Hopfinger estudiaron los cambios estructurales de las membranas celulares después de la inserción de nanotubos de carbono, y desarrollaron modelos QSAR predictivos de la influencia de dichos nanotubos en la toxicidad [68].
- iii) Fourches *et al.* desarrollaron diferentes modelos con dos sets de moléculas nanométricas y diversos ensayos celulares *in vitro*: i) 51 nanopartículas conteniendo diversos núcleos metálicos, y ii) 109

nanopartículas compartiendo un mismo núcleo metálico pero presentando diferentes modificadores de superficie. Los modelos Nano-QSAR desarrollados a partir de estos compuestos tuvieron una alta capacidad predictiva, y pueden ser utilizados para priorizar el diseño y manufactura de nanomateriales más seguros [66].

En definitiva, los modelos Nano-QSAR están todavía en una fase incipiente, dada la falta de datos disponibles para su generación y la necesidad de desarrollar nuevos descriptores capaces de identificar claramente sus propiedades estructurales. No obstante los ejemplos citados dan buena muestra de sus posibilidades, y científicos, industriales y entidades nacionales deben armonizar esfuerzos para su desarrollo regulatorio [69, 70].

Conclusiones finales

Existe un interés creciente en el uso de las tecnologías computacionales para predecir la toxicidad. En la industria, estos métodos permiten evaluar nuevos compuestos en las fases más tempranas de su desarrollo. Presentan una serie de limitaciones frente al empleo de ensayos con animales, sobre todo la escasez de datos toxicológicos disponibles y la escasa explicación de mecanismos de acción que proporcionan algunos modelos excesivamente simplistas para parámetros complejos. Las predicciones *in silico* son particularmente difíciles debido a que la toxicidad es un fenómeno multidimensional, de modo que muchos efectos toxicológicos son el resultado de cambios en múltiples procesos fisiológicos. La fiabilidad de las predicciones a menudo no está documentada suficientemente para tomar decisiones seguras y justificar la renuncia a ensayos con animales. En consecuencia, se requieren nuevos modelos y un uso más crítico de los mismos para obtener predicciones sólidas que sean aceptables también desde un punto de vista normativo. Otro problema es la ausencia de la estandarización de la información disponible tanto para las bases de datos como para el software, inconveniente caracterizado no sólo por la "dispersión metodológica", sino también la geográfica, ya que los criterios para la estimación de los datos pueden variar notablemente entre países. Por tanto, la armonización, sistematización y estandarización de criterios y métodos empleados a nivel internacional son cruciales para el futuro cercano.

A pesar de esto, el uso cuidadoso de estas técnicas por parte de especialistas convenientemente formados podría conducir a una reducción de las pruebas con animales. Entre la gran variedad de usos potenciales se pueden citar las relacionadas con el entorno regulatorio, como la clasificación y el etiquetado de compuestos químicos, su evaluación de riesgos y el establecimiento de prioridades en función de la predicción de valores toxicológicos. Los modelos predictivos *in silico* han experimentado un auge notable tras las restricciones de ensayos con animales en áreas concretas como el desarrollo de cosméticos. La aceptación de estas técnicas bajo REACH requiere del cumplimiento de condiciones más restrictivas que las requeridas en los procesos internos en las industrias especializadas, como por ejemplo en el descubrimiento de fármacos. Esto es así porque se necesita garantizar la adecuación de los resultados a los fines regulatorios (es decir, evitando riesgos innecesarios para la salud humana y el medio ambiente). Una evaluación crítica, caso por caso y la discusión de la fiabilidad de los resultados es fundamental para dar credibilidad a estas metodologías.

En definitiva, la toxicología computacional está en una fase de desarrollo, pero ya hay muchos ejemplos de su aplicación exitosa.

Muchos científicos, reguladores y el público en general creen que ahora se necesitan nuevas y mejores formas de evaluar la toxicidad humana, y los avances tecnológicos están haciendo posible su aplicación incluso a nivel regulatorio. Su mejora se acompaña por la expansión del número de grandes bases de datos y de diferentes programas especializados, y dependerá de la integración armónica de las diferentes técnicas computacionales ya existentes. En la práctica regulatoria su uso ya es posible en la UE, y así la herramienta de registro IUCLID (International Uniform Chemical Information Database, <http://iuclid.eu/>), es una aplicación que permite capturar, gestionar e intercambiar datos sobre las propiedades de las sustancias químicas, preparar los dossiers con dichos datos y enviarlos a las autoridades competentes de los diferentes países) incluye la posibilidad de aportar predicciones de QSAR siempre que sigan las directrices de la OCDE y se presenten en un formato específico denominado “QSAR Model Reporting Format” (QMRF). Las técnicas computacionales deben desempeñar pues un papel clave en la UE para reducir los ensayos con animales a gran escala de productos químicos regulados por el reglamento REACH.

Bibliografía

- European Commission (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of The European Parliament and The Council of 18 December 2006. Off J Eur Union Lett 396:1-849.
- Van Heerden S (2012) Recent developments in global regulatory framework in the chemical industry. Popul Plast Packag 57:46-50.
- Rovida C, Hartung T (2009) Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals: a report by the Transatlantic Think Tank for Toxicology (T⁴). ALTEX 26:187-208.
- Scholz S, Sela E, Blaha L, Braunbeck T, Galay-Burgos M, García-Franco M, Guinea J, Klüver N, Schirmer K, Tanneberger K, Tobor-Kapłon M, Witters H, Belanger S, Benfenati E, Creton S, Cronin MT, Eggen RI, Embry M, Ekman D, Gourmelon A, Halder M, Hardy B, Hartung T, Hubesch B, Jungmann D, Lampi MA, Lee L, Léonard M, Küster E, Lillicrap A, Luckenbach T, Murk AJ, Navas JM, Peijnenburg W, Repetto G, Salinas E, Schüürmann G, Spielmann H, Tollefsen KE, Walter-Rohde S, Whale G, Wheeler JR, Winter MJ (2013) A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. Regul Toxicol Pharmacol 67:506-530.
- Repetto G, Zurita JL, Jos A, del Peso A, Salguero M, Ríos JC, Repetto M (2005) Modelos alternativos *in vitro* para el estudio y la evaluación de neurotoxicidad. Rev Tox 22 (Suplemento).
- Nicolotti O, Benfenati E, Carotti A, Gadaleta D, Gissi A, Mangiatordi GF, Novellino E (2014) REACH and *in silico* methods: an attractive opportunity for medicinal chemists. Drug Discov Today (en prensa, DOI: 10.1016/j.drudis.2014.06.027.)
- Modi S, Hughes M, Garrow A, White A (2012) The value of *in silico* chemistry in the safety assessment of chemicals in the consumer goods and pharmaceutical industries. Drug Discov Today 17:135-142.
- Merlot C (2010) Computational toxicology - a tool for early safety evaluation. Drug Discov Today 15:16-22.
- Valerio LG Jr (2013) Predictive computational toxicology to support drug safety assessment. Methods Mol Biol 930:341-354.
- van de Waterbeemd H, Gifford E (2003) ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise?. Nat Drug Discov Rev 2:192-204.
- Dickins M, Modi S (2002) Importance of predictive ADME simulation. Drug Discov Today 7:755-756.
- Duart MJ, Antón-Fos GM, de Julián-Ortiz JV, Gozalbes R, Gálvez J, García-Domenech R (2002) Use of molecular topology for the prediction of physicochemical, pharmacokinetic and toxicological properties of a group of antihistaminic drugs. Int J Pharm 246:111-119.
- Gozalbes R, Pineda-Lucena A (2010) QSAR-based solubility model for drug-like compounds. Bioorg Med Chem 18:7078-7084.
- Gozalbes R, Jacewicz M, Annand R, Tsaïoun K, Pineda-Lucena A (2011) QSAR-based permeability model for drug-like compounds. Bioorg Med Chem 19:2615-2624.
- Merlot C (2008) *In silico* methods for early toxicity assessment. Curr Opin Drug Discov Dev 11:80-85.
- Boyer S (2009) The use of computer models in pharmaceutical safety evaluation. Altern Lab Anim 37:467-475.
- García-Domenech R, de Julián-Ortiz JV, Duart MJ, García-Torrecillas JM; Antón-Fos GM; Ríos-Santamarina I; de Gregorio Alapont C, Gálvez J (2001) Search of a topological pattern to evaluate toxicity of heterogeneous compounds. SAR QSAR Environ Res 12:237-254.
- Fourches D, Barnes JC, Day NC, Bradley P, Reed JZ, Tropsha A (2010) Cheminformatics analysis of assertions mined from literature that describes drug-induced liver injury in different species. Chem Res Toxicol 23:171-183.
- Frid AA, Matthews EJ (2010) Prediction of drug-related cardiac adverse effects in humans-B: use of QSAR programs for early detection of drug-induced cardiac toxicities. Regul Toxicol Pharmacol 56:276-289.
- Obiol-Pardo C, Gomis-Tena J, Sanz F, Saiz J, Pastor M (2011) A multiscale simulation system for the prediction of drug-induced cardiotoxicity. J Chem Inf Model 51:483-92.
- Kar S, Roy K (2011) Development and validation of a robust model for prediction of carcinogenicity of drugs. Indian J Biochem Biophys 48:111-122.
- Valerio LG Jr, Cross KP (2012) Characterization and validation of an *in silico* toxicology model to predict the mutagenic potential of drug impurities. Toxicol Appl Pharmacol 260:209-221.
- Cronin MT (2002) The current status and future applicability of quantitative structure-activity relationships (QSARs) in predicting toxicity. Altern Lab Anim 30 (Suppl 2):81-84.
- MacDonald D, Breton R, Sutcliffe R, Walker JD (2002) Uses and limitations of quantitative structure-activity relationships (QSARs) to categorize substances on the Canadian Domestic Substance List as persistent and/or bioaccumulative, and inherently toxic to non-human organisms. SAR QSAR Environ Res 13:43-55.
- Yang C, Valerio LG Jr., Arvidson KB (2009) Computational toxicology approaches at the US Food and Drug Administration. Altern Lab Anim 37:523-531.

26. Valerio LG Jr (2011) *In silico* toxicology models and databases as FDA Critical Path Initiative toolkits. *Hum Genomics* 5:200-207.
27. Matthews EJ, Contrera JF (2007) *In silico* approaches to explore toxicity end points: issues and concerns for estimating human health effects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3:125-134.
28. Contrera JF, Matthews EJ, Kruhlak NL, Benz RD (2005) *In silico* screening of chemicals for bacterial mutagenicity using electrotopological E-state indices and MDL QSAR software. *Regul Toxicol Pharmacol* 43:313-323.
29. Matthews EJ, Kruhlak NL, Benz RD, Ivanov J, Klopman G, Contrera, JF (2007) A comprehensive model for reproductive and developmental toxicity hazard identification: II. Construction of QSAR models to predict activities of untested chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 47:136-155.
30. Contrera JF, Matthews EJ, Benz RD (2003) Predicting the carcinogenic potential of pharmaceuticals in rodents using molecular structural similarity and E-state indices. *Regul Toxicol Pharmacol* 38:243-259.
31. European Parliament Resolution on the Commission White Paper on Strategy for a future Chemicals Policy, COM (2001) 88-C5-0258/2001-2001/2118 (COS) in OJ C140E of 13.6.2002.
32. Tropsha A, Gramatica P, Gombar VK (2003) The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. *QSAR Comb Sci* 22:69-77.
33. Gramatica P (2013) On the development and validation of QSAR models. *Methods Mol Biol* 930:499-526.
34. Guidance document on the validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] models. OECD Environment Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 69, Paris 2007, (www.oecd.org/ehs/).
35. European Union (2012) Regulation (EU) No 528/2012 of The European Parliament and of The Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. *Off J Eur Union Lett* 167:1-123.
36. Matthews EJ, Contrera JF (1998) A new highly specific method for predicting the carcinogenic potential of pharmaceuticals in rodents using enhanced MCASE QSAR-ES software. *Regul Toxicol Pharmacol* 28:242-264.
37. Richard AM, Gold LS, Nicklaus MC (2006) Chemical structure indexing of toxicity data on the Internet: moving toward a flat world. *Curr Opin Drug Discov Dev* 9:314-325.
38. Fourches D, Muratov E, Tropsha A (2010) Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. *J Chem Inf Model* 50:1189-1204.
39. Livingstone DJ (2000) The characterization of chemical structures using molecular properties. A survey. *J Chem Inf Comput Sci* 40:195-209.
40. Gozalbes R, Doucet JP, Derouin F (2002) Application of topological descriptors in QSAR and drug design: history and new trends. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2:93-102.
41. Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V (2010) Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. *Expert Opin Drug Discov* 5:633-654.
42. Gedeck P, Kramer C, Ertl P (2010) Computational analysis of structure-activity relationships. *Prog Med Chem* 49:113-160.
43. Toropov AA, Toropova AP, Raska I Jr, Leszczynska D, Leszczynski J (2014) Comprehension of drug toxicity: software and databases. *Comput Biol Med* 45:20-25.
44. Singla D, Dhanda SK, Chauhan JS, Bhardwaj A, Brahmachari SK, Open Source Drug Discovery Consortium, Raghava GP (2013) Open source software and web services for designing therapeutic molecules. *Curr Top Med Chem* 13:1172-1191.
45. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J (2004) Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 3:935-949.
46. Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE (1982) A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* 161:269-288.
47. Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ (1996) Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* 9:1-5.
48. Vedani A, Smiesko M, Spreafico M, Peristera O, Dobler M (2009) *VirtualToxLab™* - *in silico* prediction of the toxic (endocrine-disrupting) potential of drugs, chemicals and natural products. Two years and 2,000 compounds of experience: a progress report. *ALTEX* 26:167-176.
49. Vink SR, Mikkers J, Bouwman T, Marquart H, Kroese ED (2010) Use of read-across and tiered exposure assessment in risk assessment under REACH - a case study on a phase-in substance. *Regul Toxicol Pharmacol* 58:64-71.
50. Patlewicz G, Ball N, Booth ED, Hulzebos E, Zvinavashe E, Hennes C (2013) Use of category approaches, read-across and (Q)SAR: general considerations. *Regul Toxicol Pharmacol* 67:1-12.
51. Guzelian PS, Victoroff MS, Halmes NC, James RC, Guzelian CP (2005) Evidence-based toxicology: a comprehensive framework for causation. *Hum Exp Toxicol* 24:161-201.
52. Valerio LG Jr, Long A (2010) The *in silico* prediction of human-specific metabolites from hepatotoxic drugs. *Curr Drug Discov Technol* 7:170-187.
53. Kazius J, McGuire R, Bursi R (2005) Derivation and validation of toxicophores for mutagenicity prediction. *J Med Chem* 48:312-320.
54. Judson PN (2006) Using computer reasoning about qualitative and quantitative information to predict metabolism and toxicity. In: Testa B, Krämer SD, Wunderli-Allenspach H, Folkers G (eds) *Pharmacokinetic profiling in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Alemania). 183-215.
55. Marchant CA, Briggs KA, Long A (2008) *In silico* tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: Derek for Windows, Meteor, and Vitic. *Toxicol Mech Methods* 18:177-187.
56. Bartels M, Rick D, Lowe E, Loizou G, Price P, Spendiff M, Arnold S, Cocker J, Ball N (2012) Development of PK- and PBPK-based modeling tools for derivation of biomonitoring guidance values. *Comput Methods Programs Biomed* 108:773-788.
57. Chen A, Yarmush ML, Maguire T (2012) Physiologically based

- pharmacokinetic models: integration of *in silico* approaches with micro cell culture analogues. *Curr Drug Metab* 13:863-880.
58. Caldwell JC, Evans MV, Krishnan K (2012) Cutting edge PBPK models and analyses: providing the basis for future modeling efforts and bridges to emerging toxicology paradigms. *J Toxicol*, (Article ID 852384, 10 pages, doi:10.1155/2012/852384).
59. Kleinstreuer NC, Judson RS, Reif DM, Sipes NS, Singh AV, Chandler KJ, Dewoskin R, Dix DJ, Kavlock RJ, Knudsen TB (2011) Environmental impact on vascular development predicted by highthroughput screening. *Environ Health Perspect* 119:1596-1603.
60. Wetmore BA, Wambaugh JF, Ferguson SS, Sochaski MA, Rotroff DM, Freeman K, Clewell HJ 3rd, Dix DJ, Andersen ME, Houck KA, Allen B, Judson RS, Singh R, Kavlock RJ, Richard AM, Thomas RS (2012) Integration of dosimetry, exposure, and high-throughput screening data in chemical toxicity assessment. *Toxicol Sci* 125:157-174.
61. Clewell HJ, Andersen ME (2004) Applying mode-of-action and pharmacokinetic considerations in contemporary cancer risk assessments: an example with trichloroethylene. *Crit Rev Toxicol* 34:385-445.
62. Kuentz M, Nick S, Parrott N, Röthlisberger D (2006) A strategy for preclinical formulation development using GastroPlus as pharmacokinetic simulation tool and a statistical screening design applied to a dog study. *Eur J Pharm Sci* 27:91-99.
63. Zhu M, Nie G, Meng H, Xia T, Nel A, Zhao Y (2013) Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Acc Chem Res* 46:622-631.
64. Kraszewski S, Tarek M, Treptow W, Ramseyer C (2010) Affinity of C₆₀ neat fullerenes with membrane proteins: a computational study on potassium channels. *ACS Nano* 4:4158-4164.
65. Liu J, Yang L, Hopfinger AJ (2009) Affinity of drugs and small biologically active molecules to carbon nanotubes: a pharmacodynamics and nanotoxicity factor?. *Mol Pharm* 6:873-882.
66. Fourches D, Pu D, Tassa C, Weissleder R, Shaw SY, Mumper RJ, Tropsha A (2010) Quantitative nanostructure-activity relationship modeling. *ACS Nano* 4:5703-5712.
67. Petrova T, Rasulev BF, Toropov AA, Leszczynska D, Leszczynski J (2011) Improved model for fullerene C₆₀ solubility in organic solvents based on quantum-chemical and topological descriptors. *J Nanopart Res*, 13:3235-3247.
68. Liu J, Hopfinger AJ (2008) Identification of possible sources of nanotoxicity from carbon nanotubes inserted into membrane bilayers using membrane interaction quantitative structure-activity relationship analysis. *Chem Res Toxicol* 21:459-466.
69. Puzyn T, Leszczynska D, Leszczynski J (2009) Toward the development of "nano-QSARs": advances and challenges. *Small* 5:2494-2509.
70. Winkler DA, Mombelli E, Pietroiusti A, Tran L, Worth A, Fadeel B, McCall MJ (2013) Applying quantitative structure-activity relationship approaches to nanotoxicology: current status and future potential. *Toxicology* 313:15-23.

Aplicación de un sistema *in silico* múltiple para la priorización en la selección de compuestos antimaláricos

Castañeda-Casado P*¹, Gresham S², Jimenez-Navarro E¹, Giddings A², Muñoz-Muriedas J³, Hattotuwigama C⁴, Harvey J², Robinson S².

¹DDW Discovery Performance Unit, GSK Spain. C/ Severo Ochoa, 2. 28760 Tres Cantos (Madrid, Spain); ²Safety Assessment, GSK Ware UK; ³Computational Chemistry, GSK Stevenage UK; ⁴Scinovo, GSK Stevenage UK.

Recibido 28 octubre de 2014 / Aceptado 11 noviembre 2014

Resumen. Introducción: Como parte del compromiso de GSK en la reducción del fracaso en las fases de desarrollo clínico y preclínico, se ha implementado en las fases más tempranas de desarrollo una estrategia para evitar los problemas de genotoxicidad que son los que, en mayor manera, pueden obstaculizar la progresión a fases más avanzadas. El objetivo de este trabajo es aplicar la nueva estrategia de GSK para la priorización de compuestos que permita seleccionar aquellas estructuras con menor riesgo de genotoxicidad utilizando una combinación de herramientas computacionales que predice el resultado del test de Ames. Materiales y Métodos: Compuestos de la colección de GSK, activos en el screening fenotípico frente a *P. falciparum*, fueron utilizados en este estudio. Tres modelos, Derek Nexus (Lhasa Limited, Leeds, UK), Leadscope y un método de mecánica cuántica desarrollado internamente se utilizaron para las predicciones *in silico*. Resultados: La combinación de los tres modelos de predicción tuvo un porcentaje de éxito del 75% con sólo 1 falso positivo. Conclusiones: Moléculas con 2 o más alertas de genotoxicidad generadas por este sistema múltiple deberían ser depriorizadas o ensayadas experimentalmente cuanto antes para descartar su riesgo de genotoxicidad.

Palabras clave: *In silico*, antimaláricos, priorización, 3Rs, SAR

Abstract: Multiple *in silico* genetic toxicity alerting tools for antimalarial compounds prioritization. Introduction. As part of the commitment of GSK in reducing attrition rate in clinical and preclinical stages, it has been set up in early stages of development (H2L, Lead Op) a candidate quality strategy to avoid genotoxicity liabilities that mainly can stop the progression of compound towards advanced stages. The aim of the study is to apply the new strategy in order to triage structures with less genotoxicity risk by means an *in silico* multiple system that predicts the outcome of Ames test. Material & Methods. Active compounds against *P. falciparum* phenotypic screening from GSK collection were used. Three different models: Derek Nexus (Lhasa Limited, Leeds, UK), Leadscope and a quantum mechanics method developed internally were used for *in silico* predictions. Results. The use of three models have an accurately success rate, greater than 75% with only 1 false positives. Conclusions. Those molecules that fire 2 or more genotoxicity alerts should be deprioritised or tested experimentally in Ames test to confirm or discharge the genotoxicity risk.

Key words: *In silico*, antimalarial, prioritization, 3Rs, SAR

Introducción

La malaria es una de las enfermedades infecciosas con mayor

impacto en la salud humana, sobre todo en países en vías de desarrollo. Está causada por los estadios eritrocíticos de protozoos del género *Plasmodium* y es transmitida a humanos a través de la picadura de las hembras del mosquito *Anopheles*.

El desarrollo de nuevos fármacos, seguros, eficaces y asequibles, es uno de los elementos más importantes de la estrategia global frente a la malaria. GlaxoSmithKline hace unos diez años dedicó un centro de investigación, denominado Diseases of the Developing World (DDW), al descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la malaria, así como la tuberculosis y enfermedades producidas por kinetoplastidos (chagas, enfermedad del sueño...) La labor que se desarrolla en este centro incluye el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan encontrar mejores medicamentos para erradicar la malaria.

Así, en 2009 se realizó una campaña de screening donde se investigó la eficacia de casi dos millones de compuestos, procedentes de la colección de GSK para inhibir el crecimiento de *P. falciparum* 3D7 *in vitro*. En este proyecto se identificaron 19.451 *hits* primarios que inhibían el crecimiento del parásito en más de un 80%. Estos *hits* fueron ensayados posteriormente en dos ensayos independientes. De ellos, 13.533 compuestos con actividad antimalárica, fueron confirmados, con un ratio de confirmación alrededor del 70%, aquellos que alcanzaron una inhibición mayor o igual al 80% en al menos dos de los tres ensayos fueron seleccionados. Este set de compuestos ha sido recientemente ampliado por otras 2500 nuevas estructuras para aumentar la diversidad química y mejorar las propiedades físico-químicas, partiendo, entonces, de un total de 15114 compuestos.

Todas las estructuras químicas y datos asociados se han publicado y están disponibles para la comunidad científica en un intento de incentivar la investigación en este campo [1].

Históricamente, los compuestos que son considerados positivos en los ensayos que evalúan la potencial genotoxicidad de una nueva molécula son eliminados del proceso de selección de candidatos, pero cuando ya se han realizado numerosos ensayos *in vivo*, de eficacia, farmacocinética y se han utilizado numerosos recursos (Fig. 1).

El objetivo de este trabajo fue conseguir un sistema de priorización de compuestos que permitiera seleccionar aquellas estructuras con menor riesgo de genotoxicidad. Una aproximación *in silico* fue la que se seleccionó para predecir potencial genotoxicidad en fases iniciales del desarrollo (H2L) antes de que los compuestos requieran un mayor uso de recursos para completar sus perfiles, evitar un innecesario uso de animales y reducir los ciclos de tiempo.

* e-mail: Pablo.c.castaneda@gsk.com

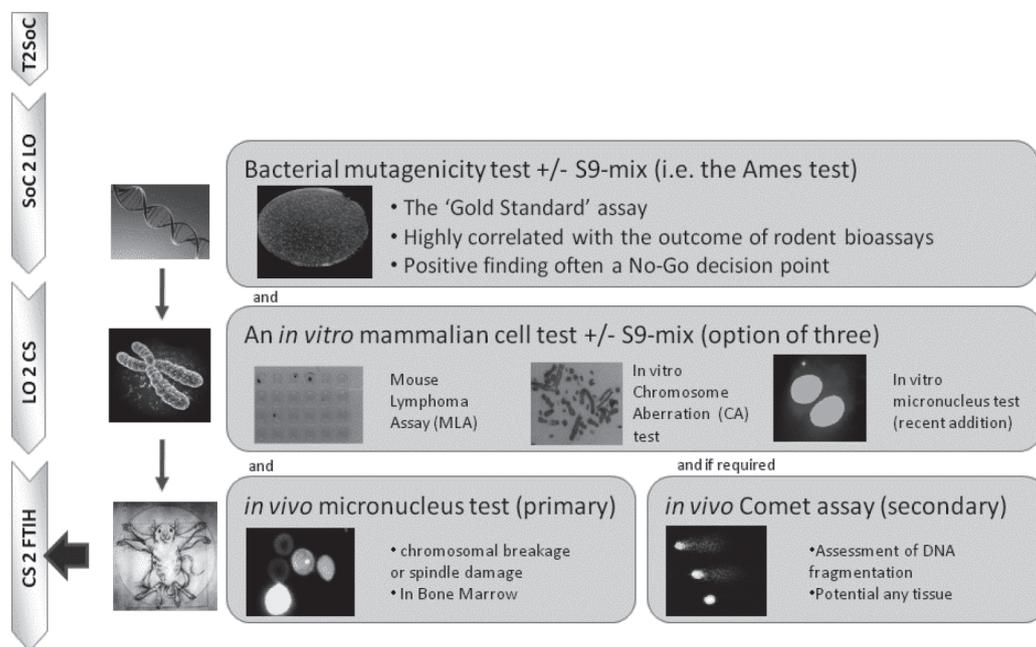


Figura 1. La progresión de candidatos a través de las alertas de genotoxicidad está fijada por los requerimientos regulatorios (ICH S2(R1)). La caracterización del riesgo carcinogénico y genotóxico está basada en una batería de pruebas ya que un test único no es capaz de detectar todos los posibles mecanismos de genotoxicidad.

Material y métodos

Compuestos

Todos los compuestos provienen de la colección particular de GSK que fueron positivos en el screening contra malaria.

Tras el ensayo fenotípico en célula entera para identificar aquellos compuestos con actividad antimalárica, se aplicaron diferentes filtros asociados a propiedades fisicoquímicas. Solo aquellos compuestos que cumplían con todos los criterios establecidos fueron seleccionados: 379 compuestos. Las moléculas seleccionadas, se agruparon en familias químicas utilizando el índice de Tanimoto obteniendo 118 clusters y seleccionamos dos o tres compuestos de cada cluster. (Fig. 3)

Test de Ames

El test de Ames se realizó de acuerdo a la guía ICH S2 [2] con ligeras modificaciones: sólo se utilizaron 3 cepas de *S. typhimurium* TA1537, TA98 y TA100 [3]. Los compuestos se ensayaron en presencia y ausencia de fracción S9 y a una concentración máxima de 1500 µg/mL. Para el test de Ames los compuestos se disolvieron en una solución madre de DMSO al 100% (v/v) a una concentración máxima de 10 mM, a partir de las cuales se obtuvieron las diluciones siguientes.

Herramientas computacionales

La predicción *in silico* consiste en establecer, mediante técnicas computacionales, la correlación de determinadas características biológicas con la estructura de nuevas entidades químicas. En el caso particular que nos compete, se busca la correlación entre el resultado del test de Ames, como principal marcador de mutagenicidad, y determinadas propiedades fisicoquímicas y características estructurales de las moléculas de interés.

La evaluación de la relación estructura-actividad (SAR) del potencial genotóxico incluye una serie de predicciones hechas a través de lo que

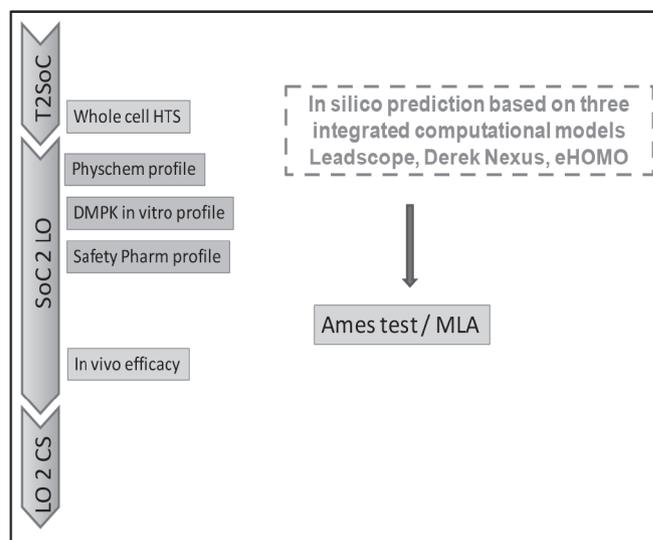


Figura 2. Nueva estrategia propuesta para la rápida progresión de compuestos. En este estudio se utilizó la selección de antimaláricos (TCAMS) para validar la reciente estrategia para mejorar la calidad de los candidatos que se ha puesto en marcha recientemente en GSK, e interrumpir el desarrollo de compuestos con serias debilidades antes de considerarlos posibles candidatos.

se conocen como sistemas expertos que son capaces de detectar alertas estructurales (toxicóforo) y modelos de predicción basados en la propia experiencia y de la base de datos de partida, entre los que se pueden incluir los de la compañía para su enriquecimiento.

Las herramientas utilizadas han sido:

1.- Derek Nexus v4.0.5 (Derek KB 2014.1.0) : es un potente sistema experto basado en el conocimiento que permite predecir la toxicidad de una nueva molécula de acuerdo a su estructura

PROPOSAL OF THE IDEAL PATH FOR SELECTING COMPOUNDS

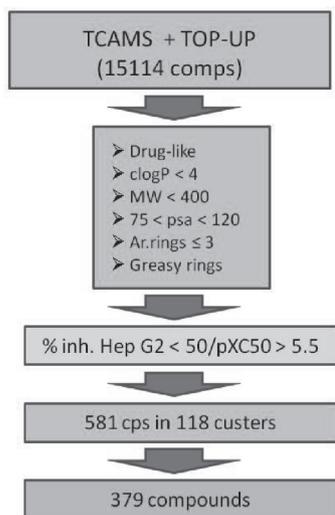


Figura 3. Criterios de calidad para la priorización de compuestos

(<http://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm>). Además Derek Nexus es una herramienta especificada en la guía ICH M7, guía para la detección de impurezas genotóxicas [4].

2.- Leadscope v1.8 (Esta versión incluye la predicción en cepas de *Salmonella* y *E.Coli*): Sistema estadístico que permite encontrar, entre posibles degradantes o metabolitos de la estructura a evaluar, aquellos que son genotóxicos (<http://www.leadscope.com/>). Esta herramienta también aparece especificada en la guía ICH M7

3.- eHOMO: es un descriptor de mecánica cuántica que mediante la medición de la energía del orbital molecular con mayor ocupación, la correlaciona con la reactividad de una molécula hacia la oxidación. Se ha demostrado que existe una correlación significativa entre el riesgo de obtener un positivo en el test de Ames y el valor de eHOMO, especialmente en aquellos compuestos que requieren activación metabólica para convertirse en genotóxicos. De acuerdo a nuestros estándares internos, los compuestos se clasifican como posiblemente no genotóxicos (baja energía HOMO) o potencialmente genotóxicos (alta energía HOMO).

Diseño experimental

De los compuestos seleccionados (118 clusters, 379 compuestos), se escogieron aquellos que cubrieran un amplio abanico de diversidad química y se analizaron con las tres herramientas *in silico* descritas anteriormente, Derek, Leadscope y eHOMO. Los compuestos se ordenaron de acuerdo a la siguiente clasificación:

1. Predicción Negativa en todas las herramientas usadas (n=17)
2. Positivos solo en Leadscope (n=2)
3. Positivos en eHOMO - SAR negativo. Se considera una alerta compuesto dependiente el resto de derivados tiene una predicción negativa (n=5)
4. Positivos en eHOMO - SAR positivo, los derivados de la misma serie también son positivos. (n=5)
5. Predicción *in silico* del test de Ames Positivo en los tres modelos. (n=5)

Se eligieron al menos dos compuestos disponibles en estado de sólido dentro de la colección interna de la compañía y que entrasen dentro de cada una de las categorías anteriores para ser ensayados

experimentalmente en una versión reducida del test de Ames. En total se seleccionaron 34 compuestos.

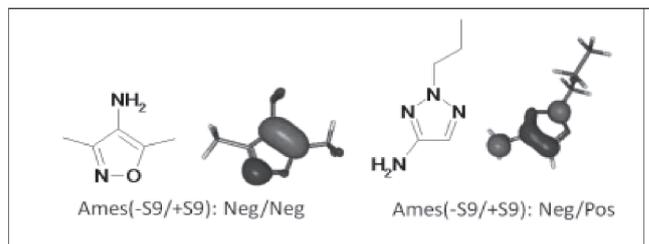


Figura 4. Ejemplo de distribución de la energía por el modelo eHOMO, dos moléculas muy parecidas, pueden tener una distribución de la energía muy diferente.

Resultados

De los 34 compuestos solo 20 compuestos pudieron finalmente ser analizados en el test de Ames reducido. En la tabla 1 se muestra el resultado del test de Ames junto con las tres predicciones de las herramientas *in silico*.

Tabla 1. Comparación de los resultados en el test de Ames con las predicciones *in silico*.

Compuesto	Test de Ames	Leadscope	eHOMO	Derek Nexus
1	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
2	Citotóxico	Negativo	Alta Energía	No alerta
3	Citotóxico	Negativo	Alta Energía	No alerta
4	Negativo	Not in domain	Baja Energía	No alerta
5	Citotóxico	Not in domain	Alta Energía	No alerta
6	Citotóxico	Positivo	Alta Energía	Quinolina
7	Positivo	Positivo	Alta Energía	No alerta
8	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
9	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
10	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
11	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
12	Negativo	Positivo	Baja Energía	No alerta
13	Negativo	Positivo	Baja Energía	No alerta
14	Negativo	Positivo	Alta Energía	No alerta
15	Negativo	Negativo	Alta Energía	No alerta
16	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
17	Negativo	Negativo	Alta Energía	No alerta
18	Negativo	Negativo	Alta Energía	No alerta
19	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
20	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
21	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
22	Negativo	Not in domain	Baja Energía	No alerta
23	Positivo	Positivo	Alta Energía	Oxima
24	Positivo	Positivo	Alta Energía	Nitro aromático

Discusión

Dentro del subset de moléculas probadas en el mini-Ames podemos ver que la aplicación de las tres herramientas *in silico* predice correctamente con éxito un 75%. Este sistema nos da una alta sensibilidad, con solo una predicción incorrecta de un falso positivo que resultó negativo experimentalmente. La tabla 2 resume los porcentajes de cada una de las predicciones: el sistema múltiple, dio

una gran sensibilidad, perdiendo sólo un compuesto que fue negativo en el test de Ames y había sido predicho como positivo.

Tabla 2. Porcentajes de correlación entre los valores experimentales y los predichos

Verdadero Positivo	Falso Positivo	Verdadero Negativo	Falso Negativo
75%	25%	100%	0%
(3/4)	(1/4)	(16/16)	(0/16)

Conclusiones

Actualmente como parte del compromiso de GSK en la reducción del fracaso en fases posteriores a la selección de candidato, se ha implementado en las más tempranas fases de desarrollo (H2L, Lead Op) una serie de filtros en cascada para eludir los problemas de genotoxicidad que son los que pueden obstaculizar, en mayor manera, el proceso de desarrollo.

Basándonos en estos datos se puede concluir que al menos con la predicción de dos positivos, de las tres herramientas utilizadas, se traduce en una alta probabilidad de ser positivo en el test de Ames.

Estos datos apoyan la estrategia general que recomienda el uso de herramientas *in silico* para seleccionar compuestos y series químicas y focalizar el proceso de *lead optimization* en las moléculas más “limpias” desde el punto de vista toxicológico. La naturaleza de la evaluación *in silico* permite integrarla desde las más tempranas fases de desarrollo, y a todo lo largo del mismo, en el proceso de toma de decisiones llegando incluso a ser de utilidad en el diseño de las nuevas moléculas.

La aplicación de estas herramientas, ha permitido al DDW progresar hasta 3 moléculas este último año hacia Preclínica, así como mantener un poblado portfolio en la fase exploratoria.

Como consecuencia de este trabajo, esta estrategia está actualmente siguiéndose también en los proyectos para tuberculosis en los que el DDW también está involucrado para crear un set de hasta 500 moléculas con actividad antituberculosa con mínimo riesgo de genotoxicidad.

Agradecimientos

Se agradece al departamento de Genetic Toxicology and Computational Chemistry de GSK R6D, y al departamento de Química del DDW (Malaria DPU) por la aplicación de los filtros físico-químicos y selección de compuestos.

Bibliografía

- Gamo FJ, Sanz LM, Vidal J, de Cozar C, Alvarez E, Lavandera JL, Vanderwall DE, Green DV, Kumar V, Hasan S, Brown JR, Peishoff CE, Cardon LR, Garcia-Bustos JF (2010) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* 465:305-310.
- ICH (2011) ICH S2(R1) Guidance on Genotoxicity and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Adopted EMA/CHMP/ICH/126642/2008. December 2011.
- Jacobson-Kram D, Contrera JF (2007) Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for Human Safety Evaluation Part I: Early Screening for Potential Human Mutagens. *Tox Sci* 96:16-20.
- ICH (2014) ICH M7 Guideline on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk reached. Step 4 version. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

Cytotoxic evaluation of a mixture of eight pollutants at environmental relevant concentrations

Pérez Martín JM, Fernández Freire P*, Peropadre A, Hazen MJ

Grupo de Toxicología celular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

Recibido 10 de enero de 2014 / Aceptado 26 octubre de 2014

Abstract: The ubiquitous presence of pollutants and the accurate evaluation of their potential risks for environmental and human health is an area of major concern. We have simulated an *in vitro* scenario of long-term exposure to a mixture of eight pollutants at real environmental concentrations using mammalian Vero cells. Our results demonstrate that cellular proliferation rates were significantly altered, either by inhibition or stimulation, depending on the mixture composition and the exposure time. We encourage the urgency of reviewing safety levels for emerging contaminants accepted by regulatory agencies, considering that mixtures of pollutants represent a threat for environmental and human health.

Keywords: Chemical mixtures, emerging contaminants, *in vitro* studies, long-term cytotoxicity.

Resumen: Evaluación de la citotoxicidad de una mezcla de ocho contaminantes a concentraciones de relevancia ambiental. La presencia ubicua de contaminantes ambientales y la adecuada evaluación de su riesgo potencial para la salud humana y ambiental es un área de gran preocupación. En este trabajo se ha simulado un escenario *in vitro* de exposición a largo plazo de una mezcla de ocho contaminantes a concentraciones reales presentes en el medio ambiente, utilizando la línea celular de mamífero Vero. Nuestros resultados demuestran que se alteran significativamente las tasas de proliferación celular, ya sea por estimulación o inhibición, dependiendo de la composición de la mezcla y del tiempo de exposición. En vista de estos resultados, recalamos la necesidad de revisar los niveles de seguridad aceptados por las agencias reguladoras para contaminantes emergentes, teniendo en cuenta que las mezclas de contaminantes representan una amenaza para la salud humana y medioambiental.

Palabras clave: Mezclas químicas, contaminantes emergentes, estudios *in vitro*, citotoxicidad a largo plazo.

Introduction

The widespread occurrence of environmental pollutants has been an area of increasing concern for the scientific community for more than 20 years. The growing consensus connecting the exposure to chemical mixtures with relevant human diseases such as cancer, diabetes, obesity, immunosuppression, allergies and infertility has multiplied the amount of studies in this subject [1,2]. Traditional substances of concern such as polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrates, pesticides, organochlorines and metals, among others, are being displaced by non-classical pollutants known as emerging contaminants, which include surfactants, plasticizers,

pharmaceuticals, industrial and food additives, personal care products and nanomaterials [3].

Both classical and emerging contaminants are usually detected at low levels (ng-µg/L) in the environment and, therefore, individual assessment studies have considered them as non-toxic. Although combined toxicity data at environmental relevant concentrations are scarce, the occurrence of joint effects even when all mixture components are below their individual toxic threshold has already been demonstrated [4,5]. Actually, an unknown number of substances coexist in natural matrices due to their stochastic and unpredictable releases, creating a one-time unique cocktail that interacts with biological systems. As their effects are mathematically unpredictable, the scientific community suggests experimental approaches aiming to unveil biological responses and mechanisms of toxic action [6,7]. Thereby, experimental designs reproducing real world situations such as chemical mixtures at environmental concentrations and long-term studies are toxicological priorities nowadays [8].

Our experimental approach focuses on the cytotoxic evaluation of a mixture of eight different environmental pollutants at concentrations detected in surface waters, hereafter referred as ERM (Table 1). Vero cell line, derived from mammalian kidney, was selected to conduct the toxicological studies, as we have already proved them to be very useful for the cytotoxic evaluation of environmental pollutants, including some individual components of the present mixture [9-13].

Table 1. Concentration and uses of the eight chemicals selected for the environmentally relevant mixture (ERM) employed in this study.

Chemicals	Use	µg/L*	Ref.
Carbamazepine (CBZ)	Pharmaceutical	236.3	Ternes et al. 2003 [19]
Sulfamethoxazole (SMX)	Pharmaceutical	2.0	Ferrari et al. 2004 [20]
Perfluorooctanoic acid (PFOA)	Flame retardant	67.0	Saito et al. 2004 [21]
Bis (2 ethylhexyl) phthalate (DEHP)	Plasticizer	97.8	Fromme et al. 2002 [22]
Rotenone (ROT)	Biocide	250.0	Wynne and Masser 2010 [23]
Pentachlorophenol (PCP)	Pesticide	1.5	Muir and Eduljee 1999 [24]
Butylated hydroxyanisole (BHA)	Additive	7000.0	Burse and Pellizzari 1983 [25]
Propyl paraben (PPB)	Additive	1.0	González-Mariño et al. 2009 [26]

* Maximum concentration detected in surface waters.

Experimental procedures

1. Cell culture and treatments.

Vero cell line (ATCC number CCL-81) was routinely grown at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 5% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine. All the cell culture reagents were from Lonza

* e-mail: paloma.fernandez@uam.es

(Switzerland). Exponentially growing cells were seeded at a density of 10^5 cells/mL in different cell culture surfaces (Falcon, Becton Dickinson, USA), depending on the experimental procedure (12 or 24 microwell plates). Following 18–20 h for properly cellular attachment, cells were exposed to the different treatments. After 24, 72, or 120 h of continuous exposure, both treated and untreated cells were gently washed with phosphate-buffered saline (PBS) and processed according to the different experimental analyses.

All drugs were purchased from Sigma (USA). Stock solutions of carbamazepine (CBZ; CAS No. 298-46-4), bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP; CAS No. 117-81-7), pentachlorophenol (PCP; CAS No. 87-86-5), and butylated hydroxyanisole (BHA; CAS No. 25013-16-5) were prepared in absolute ethanol (Panreac, Spain). Otherwise, sulfamethoxazole (SMX; CAS No. 723-46-6), perfluorooctanoic acid (PFOA; CAS No. 335-67-1), rotenone (ROT; CAS No. 83-79-4), and propylparaben (PPB; CAS No. 94-13-3) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, Panreac). These stock solutions were maintained in darkness at room temperature. Exposure solutions were prepared before use in DMEM with 1% serum and sterilized by filtration through a 0.22 μm Millipore® filter. The ethanol and DMSO concentrations in all controls and exposure groups were lower than 1 and 0.2% respectively.

2. Cytotoxicity assessment.

A battery of complementary endpoints assessing cell proliferation and viability were performed in order to obtain realistic information for environmental and human health. Cell number was estimated by quantifying total protein content (TPC) according to the method of Bradford [14]. MTT assay, that involves the reduction of the tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma) by dehydrogenases of viable cells to purple formazan, was performed according to the method of Mosmann [15]. Neutral red uptake (NRU) assay was performed following the protocol established by Borenfreund and Puerner [16]. The percentage of cells undergoing mitosis (mitotic index) was determined in cells cultured on glass coverslips into 6-well culture plates. After different exposures, cells were fixed with cold 100% methanol (v/v) during 6 min, and stained with 0.05% (w/v) toluidine blue (Sigma). Three thousand cells were scored under a Leica DMI 3000B microscope (Germany) per experimental point. Mitotic index was calculated as the ratio between the number of cells in mitosis and the total number of cells, and values were expressed as percentage of control cultures.

3. Statistical analysis.

Experiments were performed at least three times and each dose group was assayed using triplicated wells. Obtained colorimetric data were processed from absorbance values to percentage of that found in untreated cultures (percentage of control), and then represented as decreased or increased function, calculated as 100 minus the percentage of individual values. Finally, the graphical representations of toxic response were generated with individual data points of effect, and presented as the arithmetic mean \pm standard deviation using Microsoft® Office Excel® 2007. Statistical analyses, including correlations, analysis of variance (ANOVA) with the appropriate *post hoc* test (Bonferroni), and t-Student were carried out using PASW Statistic 18 (IBM-SPSS Inc., Chicago, USA). The level of statistical significance was in all cases $p \leq 0.05$. Figures were finally arranged using Adobe Photoshop® CS3.

Results and discussion

In a first set of experiments, basal cytotoxicity evaluation of ERM after 24 h exposure revealed a significant decrease in cell viability and TPC close to 60% of control untreated Vero cells (Fig. 1). The three endpoints analyzed showed a similar trend, with statistically significant correlations between TPC and both MTT ($r = 0.948$, $p \leq 0.05$) and NRU ($r = 0.926$, $p \leq 0.05$), suggesting that the effects exerted by ERM are governed by a decrease in cell number. On the contrary, cytotoxicity assays for the individual chemicals composing ERM showed no significant effects when compared with control cells, except for rotenone. Rotenone alone induced a strong and statistically significant effect upon Vero cells, equivalent to ERM treatment (t-Student, $p \leq 0.05$). Thereby, we considered this biocide as the major effector of the evaluated mixture. Nevertheless, we could not rule out the existence of other effects induced by ERM that might have been masked by the prominent influence of rotenone.

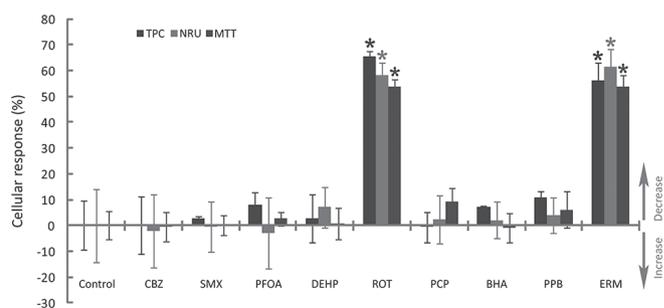


Figure 1. Cytotoxicity induced by ERM and its individual components on Vero cells after 24 h exposure. Cellular responses were classified as an increase or a decrease of the parameter analyzed, assigning zero values to untreated cultures. Asterisks indicate statistically significant differences with control cells (ANOVA, Bonferroni *post hoc* test, $p \leq 0.05$). TPC (total protein content); NRU (neutral red uptake); MTT (MTT reduction test).

In a second stage of our study, we redesigned our experimental approach evaluating new mixtures and exposure times with the same cytotoxicity endpoints. Three new mixtures based on ERM but trying to avoid the preponderant effect of rotenone were generated: ERM w/o ROT (ERM without ROT), ERM/10 (ten-fold dilution of ERM) and ERM/2 (two-fold dilution of ERM). It should be noted that, although interesting toxicological information can be acquired with short-term *in vitro* toxicity testing (24 h), a more environmental-like scenario should include longer exposure periods [17]. Thereby, the new mixtures were evaluated after 24, 72 and 120 h, allowing us to identify any possible time-dependent effect (Fig. 2).

ERM w/o ROT showed no statistically significant responses after 24 h exposure, effectively suppressing the harmful effects found with ERM. Nevertheless, unexpected increased values were detected with all the evaluated endpoints after long-term exposures, except for 72 h MTT reduction test.

A similar but even more noticeable dual response along time was observed after ERM/10 treatments. Interestingly, the highest dilution of ERM completely changed the cellular behavior with the longest exposure time (120 h). While 24 and 72 h lead to a mild decrease of the evaluated endpoint, which was statistically significant only for NRU and TPC, 120 h dramatically increased the cellular response for all the endpoints, varying the cytotoxic profile. Such a relevant rise, especially for NRU and TPC, could only be explained by a concomitant increase in the amount of cells after the 120 h treatment. To confirm whether an enhanced cell division rate was responsible

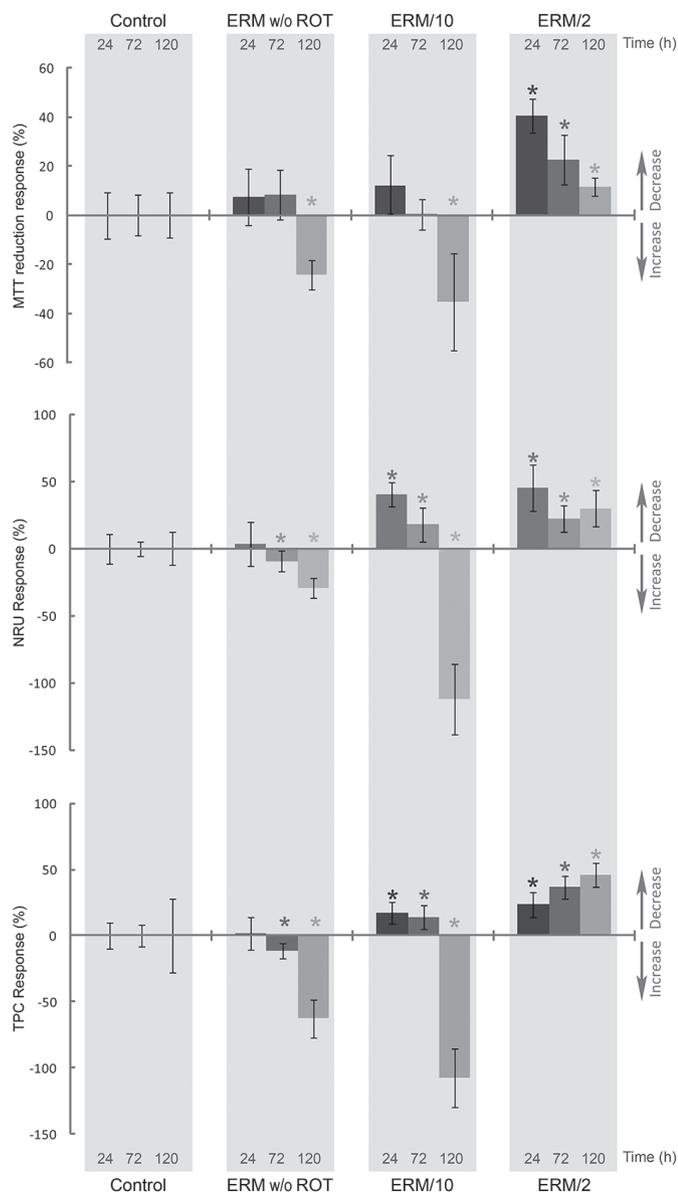


Figure 2. Cellular responses (MTT reduction, NRU and TPC) of Vero cells exposed during 24, 72 and 120 h to ERM (environmentally relevant mixture), ERM w/o ROT (ERM without rotenone), ERM/2 (ERM diluted twice) and ERM/10 (ERM diluted ten times). Asterisks indicate statistically significant differences with control cells (ANOVA, Bonferroni *post hoc* test, $p \leq 0.05$).

for those variations, mitotic index (MI) scoring after 120 h exposure to ERM/10 and ERM w/o ROT was performed. Statistically significant increases (ANOVA, *post hoc* test $p \leq 0.05$) in MI were detected for ERM/10 ($185.3 \pm 0.2\%$) and ERM w/o ROT ($147.9 \pm 18.2\%$) when compared with control untreated cells ($100.0 \pm 16.9\%$).

Finally, the ERM/2 mixture induced a significant decrease in cell response, although attenuated when compared with original ERM mixture. Remarkably, this decrease was not proportional to the dilution factor after 24 h, with values being somewhat higher than half the previously detected effect of ERM. Time-increases led to statistically significant but lower responses than those after 24 h exposure for all the endpoints. However, TPC time-dependent reduction reached a maximum response of $45.8 \pm 9.3\%$ of control

cells after treatments for 120 h. Theoretically, the dilution of a dangerous substance or preparation should decrease its detrimental effects, but the similarity between the cellular responses of ERM/2 and ERM treatments indicates that not in this case. Most probably, the toxic mechanism underlying this cytostatic response coincides with our previous results suggesting that inhibition of Vero cells proliferation caused by rotenone is due to anomalous mitotic spindle, eventually leading to mitotic catastrophe and cell death [9].

Given the strong variability of cellular responses observed even with our simple battery of endpoints when introducing slight changes in the exposure time or final concentrations, it is tempting to suggest that toxicological evaluation of chemical mixtures must be conducted considering each particular combination of chemicals as an autonomous entity.

Overall, our study encourages the urgency of reviewing the current safety levels determined for chemical substances in the environment as well as the assumed safety burdens accepted by regulatory agencies, considering that long-term exposure to chemical mixtures represent a real threat for environmental and human health. Furthermore, we support the importance of unraveling the mechanism of toxic action of chemical mixtures, in view of the new trends in toxicology claiming for the definition of adverse outcome pathways [18].

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (CTM2008-00311; CTM2012-31344).

References

- De Rosa CT, Hicks HE, Ashizawa AE, Pohl HR, Mumtaz MM (2006) A regional approach to assess the impact of living in a chemical world. *Ann NY Acad Sci* 1076: 829–838.
- Edwards TM, Myers JP (2007) Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ Health Perspect* 115: 1264–1270.
- Stuart M, Lapworth D, Crane E, Hart A (2012) Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci Total Environ* 416: 1–21.
- Kortenkamp A (2007) Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 115: 98–105.
- Pomati F, Orlandi C, Clerici M, Luciani F, Zuccato E (2008) Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicol Sci* 102: 129–137.
- Mason AM, Borgert CJ, Bus JS, Moiz Mumtaz M, Simmons JE, Sipes IG (2007) Improving the scientific foundation for mixtures joint toxicity and risk assessment: contributions from the SOT mixtures project—introduction. *Toxicol Appl Pharmacol* 223: 99–103.
- Teuschler L, Klaunig J, Carney E, Chambers J, Conolly R, Gennings C, Giesy J, Hertzberg R, Klaassen C, Kodell R, Paustenbach, D, Yang, R (2002) Support of science-based decisions concerning the evaluation of the toxicology of mixtures: a new beginning. *Regul Toxicol Pharmacol* 36: 34–39.

8. Teuschler LK (2007) Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 223: 139–147.
9. Fernández Freire P, Peropadre A, Pérez Martín JM, Herrero Ó, Hazen MJ (2009) An integrated cellular model to evaluate cytotoxic effects in mammalian cell lines. *Toxicol In Vitro* 23: 1553–1558.
10. Fernández Freire P, Pérez Martín JM, Herrero Ó, Peropadre A, de la Peña E, Hazen MJ (2008) *In vitro* assessment of the cytotoxic and mutagenic potential of perfluorooctanoic acid. *Toxicol In Vitro* 22: 1228–1233.
11. Labrador V, Fernández Freire P, Pérez Martín JM, Hazen MJ (2007) Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells. *Cell Biol Toxicol* 23: 189–199.
12. Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Labrador V, Hazen MJ (2008) Carbamazepine induces mitotic arrest in mammalian Vero cells. *Mutat Res* 637: 124–133.
13. Peropadre A, Fernández Freire P, Herrero Ó, Pérez Martín JM, Hazen MJ (2013) Cytotoxic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on cultured mammalian cells. *Curr Top Toxicol* 9: 35–42.
14. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
15. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63.
16. Borenfreund E, Puerner JA (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24: 119–124.
17. Pfaller W, Balls M, Clothier R, Coecke S, Dierickx P, Ekwall B, Hanley BA, Hartung T, Prieto P, Ryan MP, Schmuck G, Sladowski D, Vericat JA, Wendel A, Wolf A, Zimmer J (2001) Novel advanced *in vitro* methods for long-term toxicity testing: the report and recommendations of ECVAM workshop 45. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Altern Lab Anim* 29: 393–426.
18. Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schmieder PK, Serrano JA, Tietge JE, Villeneuve DL (2010) Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 29: 730–741.
19. Ternes TA, Stüber J, Herrmann N, McDowell D, Ried A, Kampmann M, Teiser B (2003) Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res* 37: 1976–1982.
20. Ferrari B, Mons R, Vولات B, Fraysse B, Paxéus N, Lo Giudice R, Pollio A, Garric J (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ Toxicol Chem* 23: 1344–1354.
21. Saito N, Harada K, Inoue K, Sasaki K, Yoshinaga T, Koizumi A (2004) Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. *J Occup Health* 46: 49–59.
22. Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A (2002) Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res* 36: 1429–1438.
23. Wynne F, Masser MP (2010) Removing fish from ponds with rotenone. *South Reg Aquac Cent Publ* 4101: 1–4.
24. Muir J, Eduljee G (1999) PCP in the freshwater and marine environment of the European Union. *Sci Total Environ* 236: 41–56.
25. Bursley J, Pellizzari E (1983) Analysis of industrial wastewater for organic pollutants in consent decree survey. U.S. Environmental Protection Agency. Athens (Georgia, EE.UU.). 174 p.
26. González-Mariño I, Quintana JB, Rodríguez I, Cela R (2009) Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23: 1756–1766.

Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad

Herrero O^{1*}, Planelló R¹, Gómez-Sande P^{2,3}, Aquilino M¹, Morcillo G¹

¹Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Departamento de Física Matemática y de Fluidos, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Paseo de la Senda del Rey 9, 28040 Madrid. ²Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Sur s/n, 15782 Santiago de Compostela. ³Estación de Hidrobiología "Encoro do Con", Universidad de Santiago de Compostela, Castroagudín s/n, 36617 Vilagarcía de Arousa.

Recibido 9 de septiembre de 2014 / Aceptado 15 de octubre de 2014

Resumen: Los quironómidos, un género de mosquitos no picadores, son organismos centinela en la evaluación de la calidad de las aguas y un modelo de relevancia ecotoxicológica para el estudio de los efectos de contaminantes ambientales. Son todavía muy escasos los trabajos con poblaciones naturales de este organismo en los que se valore la utilidad de biomarcadores moleculares en el análisis de la salud de individuos expuestos a múltiples variables de estrés. Nuestros resultados muestran que exposiciones de larvas de poblaciones naturales de *Chironomus riparius* a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butil bencil ftalato (BBP), dos compuestos incluidos por la ECHA en la lista de sustancias de muy alta preocupación, provocan alteraciones rápidas en la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta celular de estrés (*hsp70* y *hsc70*), la ruta hormonal (*EcR* y *ERR*) y los mecanismos de detoxificación (*CYP4G*), así como en la actividad enzimática de GST. Ambos compuestos provocan respuestas diferentes en estas dianas, especialmente en las exposiciones más prolongadas, y tienen la capacidad de producir efectos tóxicos retardados. Son de especial relevancia los resultados que muestran la alteración de la ruta hormonal de la ecdisona, confirmando la capacidad disruptora endocrina en insectos de estos ftalatos. Por último, existen diferencias respecto a datos previos obtenidos con larvas de laboratorio, tanto en la toxicidad de DEHP y BBP como en el comportamiento de algunas dianas, lo que acentúa la necesidad de llevar a cabo análisis con diferentes poblaciones para conseguir una aproximación más realista a los efectos de contaminantes.

Palabras clave: Ecotoxicología, *Chironomus*, ftalatos, biomarcadores moleculares, RT-PCR

Abstract: Evaluation of the toxic effects of phthalates on natural populations of *Chironomus riparius* (Diptera): implications for ecotoxicity studies. Chironomids, a genus of non-biting midges, are considered sentinel organisms for the evaluation of water quality and an outstanding model in Ecotoxicology for studying the effects of environmental pollutants. In contrast to its widespread use in studies with laboratory cultures, the use of natural populations (chronically exposed to complex mixtures of pollutants in their environment) is still uncommon to assess the usefulness of molecular biomarkers in studying the health of populations under multiple stress conditions. In *Chironomus riparius*, our results show that both bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and benzyl butyl phthalate (BBP) cause rapid alterations in the activity of GST enzyme as well as in the expression profile of various genes related to cell stress response (*hsp70* and *hsc70*), to the hormonal route (*EcR* and *ERR*) and to detoxification mechanisms (*CYP4G*). Both compounds cause different responses to these targets, especially in longer exposures, and have the ability to

produce delayed toxicity. The alteration of the ecdysone hormone pathway in our experiments has special relevance, since it proves that both compounds are endocrine disruptors in insects. Finally, this study shows differences with previous data obtained with laboratory cultures in both the toxicity of these phthalates and the behavior of some targets, which emphasizes the need of carrying out studies with different populations to get a more realistic approach to the effects of contaminants.

Keywords: Ecotoxicology, *Chironomus*, phthalates, molecular biomarkers, RT-PCR

Introducción

El deterioro ambiental que en las últimas décadas se viene produciendo a causa de multitud de contaminantes químicos de origen antropogénico es quizás más preocupante en los ecosistemas acuáticos, donde estas sustancias se integran en un complejo ciclo en el que están implicados las aguas, los sedimentos y los organismos, pudiendo tener un efecto tóxico directo y/o bioacumularse a través de las cadenas tróficas. Muchos de los contaminantes persistentes, bioacumulables y tóxicos se asocian fuertemente con los sedimentos a causa de sus características físico-químicas e ingresan frecuentemente en la cadena alimentaria a través de los organismos bentónicos, que constituyen la base de la alimentación de organismos superiores. En último término, se acumulan en predadores, entre los que se incluye el hombre, lo que pone de manifiesto la importancia de analizar el efecto de su toxicidad para organismos de las escalas inferiores de las redes tróficas.

De entre esa multitud de contaminantes, el grupo de los ftalatos ha despertado un gran interés en los últimos años debido a su elevada producción, su carácter ubicuo y las diversas propiedades tóxicas de varios de sus miembros [1-3]. Son compuestos oleosos, incoloros, inodoros y con múltiples aplicaciones en la industria, en medicina y en productos de consumo. Se emplean como plastificantes, en dispositivos de uso médico, cosméticos, envases alimentarios, calzado, cables eléctricos, embalajes, juguetes, pavimentos, etc. [4-6]. Dentro de este grupo de sustancias se encuentran, entre otras, el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y el butil bencil ftalato (BBP), ambos identificados por la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA) como sustancias de muy alta preocupación (SVHC, *substance of very high concern*) por sus propiedades tóxicas para la reproducción [7-9].

El DEHP es un líquido incoloro soluble en disolventes apolares y muy poco soluble en agua. Es el plastificante más usado en el mundo y también el más empleado en la fabricación de productos médicos [3,10]. Por su elevado coeficiente de reparto octanol-agua cabe

* e-mail: oscar.herrero@ccia.uned.es

esperar que el DEHP disponible en el medio se adsorba fuertemente a la materia orgánica, lo que unido a su baja solubilidad en agua hace que tenga mayor afinidad para unirse a la fase particulada de los medios en los que se encuentra [11]. Los valores de bioacumulación del DEHP varían en función de las especies empleadas en los estudios, fundamentalmente debido a las distintas tasas de metabolización existentes entre unas y otras [12].

La mayoría de los datos disponibles en la actualidad acerca de la toxicidad del DEHP proceden de estudios experimentales *in vivo* en vertebrados, existiendo evidencias suficientes de su toxicidad en órganos reproductores [13,14], hígado, riñón [15-17] y aparato respiratorio [18]. Asimismo, se han descrito efectos teratogénicos [19], carcinogénicos [16,17,20] y genotóxicos, aunque el compuesto no parece inducir lesiones directas en el ADN en la mayor parte de los estudios y estos resultados pueden ser atribuibles a otras vías diferentes, como la epigenética [21,22]. Puede alterar diferentes parámetros reproductivos y del desarrollo [23-27] y se ha descrito su capacidad disruptora endocrina en distintas especies [3,28]. En quironómidos, el DEHP provoca un descenso en las tasas de eclosión de huevos [29], alteraciones del desarrollo larvario [30] y variaciones en los niveles de expresión de genes que codifican para las proteínas de choque térmico HSP40, HSP70 y HSP90 [31-33], la proteína ribosómica S3 [34], los genes de la ruta hormonal *EcR* y *ERR* [33,35], de la alcohol deshidrogenasa [36], la endopeptidasa [37], la calponina [38] y la hemoglobina [32].

En cuanto al BBP, es también un líquido incoloro y poco soluble en agua. Además de su uso principal como plastificante [2], aparece también como intermediario orgánico, solvente y fijador en perfumes [39]. La separación del BBP de los materiales que lo contienen y su entrada en el medio ambiente se produce fundamentalmente a partir de los residuos depositados en vertederos, los procesos de incineración y los lodos provenientes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), unas veces eliminados en vertederos y otras empleados como enmiendas orgánicas para la fertilización de suelos [39,40].

En cuanto a los efectos adversos del BBP sobre la salud humana y medioambiental, los estudios son mucho menos numerosos que en el caso del DEHP. El compuesto ha demostrado afectar al comportamiento de los organismos expuestos [41,42] y a la calidad de su esperma [6,43], ser estrogénico [44,45], alterar la síntesis de vitelogenina [44] y los niveles de peroxidación lipídica, así como la expresión de genes codificantes para enzimas relacionadas con el metabolismo de xenobióticos (citocromos, catalasa y receptor de andrógenos) [46]. Estudios *in vitro* han comprobado que el BBP se une al receptor de estrógenos [45,47,48]. En invertebrados, se han observado descensos significativos en la actividad fenoloxidasas y superóxido/reductasa [49], así como efectos adversos sobre la embriogénesis y el desarrollo larvario [50] y el éxito reproductivo y la esperanza de vida [51]. Por último, la exposición a BBP de larvas de *Chironomus riparius* provocó en éstas un aumento de la mortalidad, alteraciones en sus niveles de ARNr de nueva síntesis y variaciones significativas de la expresión de los genes *hsp70* y *EcR* [33].

Los estudios sobre el impacto biológico de los ftalatos en invertebrados, en especial en organismos bentónicos, siguen siendo muy limitados en la actualidad, aunque numerosos informes a nivel internacional abogan por la necesidad de conocer en detalle los efectos que provocan en estos grupos animales [52,53] debido a su importancia en el mantenimiento de la homeostasis de los ecosistemas. Actualmente, un importante número de alternativas en Toxicología Ambiental se basan en el empleo de organismos

inferiores y/o no protegidos por la legislación actual [54-57], entre los que los quironómidos han sido considerados organismos modelo en estudios de contaminación natural o antropogénica [58,59] y en el análisis de la bioacumulación de contaminantes tóxicos asociados a sedimentos [60,61], habiéndose empleado para ello tanto poblaciones cultivadas y mantenidas en laboratorio como poblaciones naturales [62-64].

Asimismo, la genómica ambiental combina técnicas moleculares de alto rendimiento en poblaciones naturales con los actuales enfoques ecotoxicológicos, favoreciendo la aparición de herramientas moleculares que, desde una perspectiva ecológica, posibiliten un conocimiento más profundo de las respuestas específicas de los organismos a contaminantes [65] y conduzcan hacia una evaluación del riesgo más eficaz [66]. En este sentido, aunque en última instancia son los cambios en los patrones de proteínas los responsables de un efecto fisiológico en los seres vivos, la detección temprana mediante técnicas de PCR de variaciones en el patrón de actividad génica, expresada en términos de alteraciones en los niveles de ARN, resulta una aproximación de gran utilidad para analizar los daños provocados por la exposición a tóxicos [67]. Sin embargo, hasta la fecha, el análisis de biomarcadores moleculares en poblaciones de campo es muy limitado en este grupo de insectos.

Los estudios ecotoxicológicos convencionales a menudo no tienen en cuenta la complejidad de la vida en la naturaleza, existiendo una falta de correspondencia entre las condiciones de laboratorio y las de campo que puede conducir a errores en las evaluaciones del riesgo ecológico [68]. En este contexto, los efectos de la exposición a sustancias tóxicas deben ser analizados también en organismos procedentes de escenario reales, adaptados a multitud de factores de estrés en su medio habitual, como por ejemplo la exposición crónica a mezclas complejas de contaminantes. En el presente trabajo se seleccionaron diferentes parámetros subcelulares y moleculares de *Chironomus riparius* con el fin evaluar los efectos tóxicos del DEHP y el BBP en larvas procedentes de un hábitat natural y valorar su posible utilidad como biomarcadores tempranos de exposición a estos compuestos.

Material y métodos

Especie de estudio y área de muestreo

Los experimentos se llevaron a cabo con larvas acuáticas de estadio IV del mosquito *Chironomus riparius* (Meigen), organismo de referencia en toxicología acuática. Para su recolección se empleó una pequeña red de mano de 15 cm de diámetro, 20 cm de profundidad y 250 µm de luz de malla. Para la recolección de muestras del organismo de ensayo, se seleccionaron cuatro puntos dentro de un área del río Sar que engloba aproximadamente 100 metros de rivera a ambos lados del puente de la carretera que enlaza Bertamiráns con A Condomiña (A Coruña, España, 42°51'22.99"N 8°38'53.58"O). Las propiedades físico-químicas de la columna de agua en dichos puntos se midieron *in situ* y sus valores medios se detallan en la Tabla 1.

Compuestos y tratamientos

Para el presente estudio se seleccionaron dos plastificantes pertenecientes al grupo de los ftalatos: di (2-etilhexil) ftalato (DEHP; N° CAS 117-81-7; Fluka) y butil bencil ftalato (BBP; N° CAS 85-68-7; Fluka). Para cada uno de ellos, la concentración evaluada fue 1 µg·L⁻¹, seleccionada en base a trabajos previos con este organismo [31,36-38] y a concentraciones de estos compuestos detectadas en escenarios naturales [12,39]. La concentración de estudio se obtuvo

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de muestras de agua del río Sar procedentes de los puntos seleccionados para la recolección de *C. riparius* (valores medios) [69].

T (°C)	16.4
pH	6.8
Oxígeno disuelto (mg·L ⁻¹)	6.16
Saturación de oxígeno (%)	84.1
Conductividad (µS·cm ⁻¹)	228
Sólidos disueltos totales (mg·L ⁻¹)	145.8
Materia orgánica (%)	2.3

añadiendo el volumen adecuado de una solución madre del compuesto en etanol absoluto (BDH Prolabo) a 30 ml de medio de cultivo salino [CaCl₂ (0,5 mM), NaCl (1mM), MgSO₄ (1mM), NaHCO₃ (0,1mM), KH₂PO₄ (0,025mM), FeCl₃ (0,01mM)] preparado según los protocolos estandarizados para ensayos de toxicidad [55,70], en cubetas individuales, bajo condiciones de aireación constante a 20°C y periodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Todos los reactivos empleados para el medio de cultivo son de VWR. Los tratamientos consistieron en la exposición de grupos de 30 larvas a uno u otro compuesto durante 24 o 48 horas (toxicidad aguda), así como en su exposición durante 24 horas y mantenimiento 24 horas más en medio de cultivo sin el compuesto (toxicidad retardada). Todos los tratamientos contaron con un total de 20 larvas divididas en grupos de cinco, realizándose por triplicado los experimentos con cada uno. Se llevaron en paralelo controles y controles con etanol (con una concentración del 0,1%, la misma empleada para vehicular los ftalatos en los grupos expuestos), no detectándose diferencias estadísticas entre ambos en ninguna de las dianas estudiadas. Transcurrido el tiempo de cada tratamiento, se llevó a cabo el recuento de las larvas supervivientes en las cubetas y éstas se almacenaron en grupos de 5 en viales de congelación a -80°C hasta su uso posterior para los análisis de expresión génica o de actividad enzimática.

Extracción de ARN

El ARN de las larvas congeladas tras los tratamientos se extrajo utilizando isotiocianato de guanidina. Para ello, se homogenizaron en 500 µL de TRIzol® (Invitrogen™) y se incubaron 5' a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron 10' a 4 °C 10000 rpm. Una vez recogido el sobrenadante se añadieron 150 µL de cloroformo, incubando a temperatura ambiente durante 3'. A continuación se centrifugaron durante 15' a 4°C y 15000 rpm. La fase acuosa fue transferida a otro tubo, al que se añadieron 150 µL de isopropanol (BDH Prolabo) para precipitar el ARN. Tras incubar durante 10' a temperatura ambiente, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm a 4°C durante 15'. Tras un lavado con 500 µL con etanol al 70%, las muestras se resuspendieron en agua DEPC, se trataron con DNasa libre de RNasa (Roche) y se retiraron las enzimas mediante fenolización. Finalmente, se determinó la cantidad y calidad del RNA de cada muestra en gel de agarosa al 1,5% y midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Para la transcripción inversa se empleó el kit comercial *M-MLV Reverse Transcriptase*

(Invitrogen™) a partir de 500 ng de ARN de cada muestra. A cada una se añadieron 1 µL Oligo (poliT) (0,5 µg/µL) (Sigma), 1 µL dNTP Mix (10 mM) (Biotools) y agua DEPC hasta un volumen final de 12 µL. La mezcla se incubó durante 5' a 65°C y se mantuvo en hielo durante 10'. A continuación se añadieron 4 µL First-Strand Buffer (5x) (Invitrogen™), 2 µL DTT (0.1 M) (Invitrogen™), 1 µL de M-MLV RT (Invitrogen™) y se incubaron 50' a 37°C, inactivando posteriormente la reacción a 70°C durante 15'.

Partiendo del ADNc obtenido en la retrotranscripción, se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos de los genes de estudio mediante la técnica de PCR en un termociclador Sprint (Thermo Scientific). Como gen de referencia se utilizó *GAPDH*. Para evitar la saturación del gen de referencia y minimizar errores derivados del pipeteo, se preparó una mezcla con todos los componentes necesarios para la amplificación (incluido el ADNc) a excepción de los oligonucleótidos, que se añadieron específicamente a cada tubo. De este modo, para cada muestra de ADNc se pueden amplificar todos los genes a la vez y todos los tubos se preparan de manera homogénea. La PCR se llevó a cabo en 20 µL con 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Biotools), 0,4 mM de cada oligonucleótido y 0,2 µL de Taq Polimerasa (Biotools) en las siguientes condiciones: 30" desnaturalización, 15" anillamiento (a 55°C) y 10" de elongación final. Dependiendo de cada gen se realizaron amplificaciones de 24 o 30 ciclos. Los productos de la PCR se analizaron por medio de electroforesis en gel de acrilamida al 9% en TGE 1x durante 3 horas a voltaje constante de 60 mV. La captura de imágenes se realizó con el transiluminador UV del equipo Chemigenius 3 (Syngene) y las bandas obtenidas en los geles se cuantificaron con el software Image J 1.47q.

Tabla 2. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados en los análisis de expresión génica. Se detallan los genes de estudio, los cebadores directo (F) e inverso (R), el origen de las secuencias para cada uno de ellos y las longitudes en pares de bases (pb) de los fragmentos que amplifican.

Gen	Cebadores	Referencia	Longitud
<i>GAPDH</i>	F GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG R TAATCCTTGGATTGCATGT ACTTG	[71]	110 pb
<i>hsc70</i>	F CGTGCTATGACTAAGGACAA R GCTTCATTGACCATACGTTTC	[72]	239 pb
<i>hsp70</i>	F CATGTGAACGAGCCAAGAGA R TTGCCACAGAAGAAATCTTG	[73]	274 pb
<i>EcR</i>	F AGACGGTTATGAACAGCC R CGAGCCATGCGCAACATC	[74]	240 pb
<i>ERR</i>	F CTCAGCAAGTAAGGAGGAG R CGTCTAATAATGTGATCGG	[75]	222 pb
<i>CYP4G</i>	F GACATTGATGAGAATGATGTTGGTG R TAAGTGGAACTGGTGGGTACAT	[76]	340 pb

Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas, las muestras previamente congeladas se homogeneizaron en 0,5 mL de tampón Tris-EDTA (40 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,8, con medio completo EDTA 7x libre de proteasa (Roche)). Tras una centrifugación de 15' a 4°C y 500 rpm, se recogió el sobrenadante y se centrifugaron de nuevo a 4°C durante 30' a 10000 rpm. La determinación de la cantidad de proteínas en cada muestra se realizó con el kit *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific). Las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso.

Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST)

La valoración de la actividad enzimática de GST se realizó a partir 25 µg de proteína con el kit *Glutathione S-Transferase assay* (Sigma),

basado en la utilización de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB) como sustrato para la detección de diferentes isozimas de esta enzima. La conjugación del grupo tiol del glutatión al CDNB produce un aumento en la absorbancia 340 nm. Para calcular los cambios en la actividad de la enzima se utilizaron las variaciones en los valores de absorbancia medida a 340 nm.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM, Nueva York, EE.UU.). Se realizaron test normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene) y los datos experimentales se analizaron en función de sus resultados, del siguiente modo:

- Muestras homogéneas y normales (paramétricas) se analizaron mediante ANOVA con un *post hoc* Games Howell o Tukey, en cada caso el más apropiado. Las diferencias se consideraron significativas a un valor $p < 0,05$.
- Muestras no homogéneas o no normales (consideradas no paramétricas), se analizaron mediante Kruskal-Wallis, determinando las diferencias entre los pares mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las probabilidades se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a un valor $p < 0,05$.

Resultados

Análisis de la supervivencia

Se analizó en primer lugar la capacidad del DEHP y el BBP de comprometer la supervivencia de larvas expuestas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de uno u otro compuesto. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1, donde se observa un efecto dependiente de tiempo que no resultó estadísticamente significativo en ninguna de las condiciones analizadas. El DEHP resultó ser más tóxico que el BBP, especialmente en las exposiciones más largas, donde la mortalidad se acercó a valores del 40%. Los resultados de toxicidad retardada demuestran que la retirada de los compuestos del medio de cultivo no favoreció la supervivencia de las larvas, que incluso llegó a ser inferior en el caso del BBP en comparación con las 48 horas continuas de exposición, el tiempo equivalente.

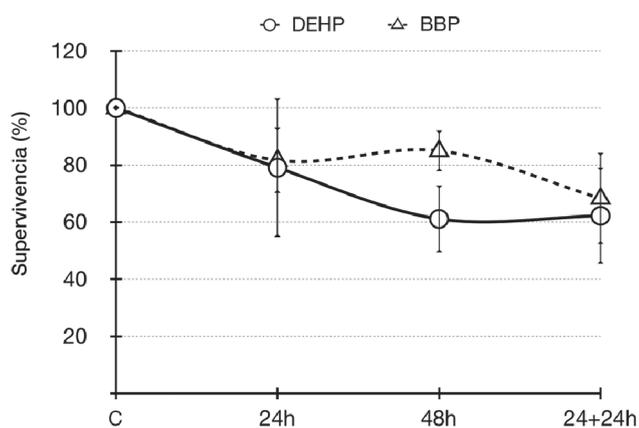


Figura 1. Supervivencia de larvas de *C. riparius* expuestas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DEHP o BBP durante 24 y 48 horas, así como de larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: porcentaje de supervivencia ($M \pm SE$). * Diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Estudios de expresión génica y actividad de GST

Los efectos provocados por el DEHP en los genes analizados consistieron en una disminución generalizada de los niveles de expresión génica (Figura 2). Se detectó una represión significativa de los genes de choque térmico (*hsc70* y *hsp70*) a las 48 horas de exposición, mucho más acentuada en el caso del receptor de la ecdisona (*EcR*) y casi completa en el del citocromo P450 (*CYP4G*). Para estos dos últimos genes y para el receptor relacionado con estrógenos (*ERR*) la represión resultó significativa ya desde las 24 horas. Cabe destacar la disminución de los niveles de transcrito observados en el gen *hsc70*, que habitualmente hace honor a su condición de gen constitutivo mostrando una gran estabilidad, viéndose sin embargo en esta ocasión afectado por la exposición a DEHP en los experimentos de mayor duración.

En los experimentos de toxicidad retardada sobresalen la fuerte recuperación del gen *hsp70*, que no mostró efecto aparente tras 24 horas de exposición a DEHP y alcanzó valores tres veces y media por encima de los del control en las 24 horas siguientes sin el compuesto, así como la recuperación de la actividad del gen *EcR*, aunque sin llegar a alcanzar los valores de las larvas no expuestas. Por el contrario, los genes *ERR* y *CYP4G* no solo no fueron capaces de reactivarse tras la represión producida a las 24 horas de tratamiento, sino que su represión se acentuó notablemente en las 24 horas siguientes.

Respecto a los efectos sobre las rutas de detoxificación, las respuestas observadas fueron notablemente distintas entre los niveles de expresión del gen *CYP4G* y de actividad de la enzima glutatión S-transferasa, representantes respectivamente de las rutas de desintoxicación de fase I y fase II. Mientras que *CYP4G* manifestó una represión significativa desde las primeras 24 horas, que se acentuó tras la retirada del tóxico y llevó a una inhibición casi absoluta en las exposiciones continuadas de 48 horas, la actividad de GST se vio favorecida significativamente tras 24 horas de contacto con el compuesto y mantuvo valores próximos a los del control en todos los experimentos de 48 horas.

En el caso de las exposiciones a BBP, la respuesta de los distintos genes estudiados fue notablemente distinta a la observada con el otro ftalato. Mientras que con el DEHP los niveles de expresión tendían a reprimirse de manera generalizada, las larvas expuestas a BBP manifestaron por lo general un claro aumento en los niveles de transcrito, especialmente en los tiempos más largos (Figura 3).

En primer lugar, los resultados reflejan la clara inducción de los dos genes de estrés estudiados, alcanzando en el caso de *hsp70* valores 15 veces por encima de los del control. Tal y como se ha comentado para el caso del DEHP, destaca de nuevo la alteración de los niveles del gen constitutivo *hsc70*, que en esta ocasión sufre una significativa activación dependiente de tiempo.

El efecto del BBP fue muy similar en los dos genes seleccionados de la ruta endocrina de los insectos (*EcR* y *ERR*), en los que produjo una notable represión tras 24 horas de exposición al compuesto seguida de una fuerte sobreexpresión en las 24 horas siguientes con o sin tóxico, llegando a superar en este último caso en más de 5 veces los valores obtenidos con larvas no expuestas.

En cuanto a las rutas de detoxificación, por un lado el BBP indujo notablemente los procesos de fase I mediante la sobreexpresión significativa del gen *CYP4G* en todas las condiciones experimentales analizadas, al contrario de lo ocurrido en las exposiciones a DEHP. Especialmente destacables son el drástico aumento de la transcripción en las exposiciones de 48 horas, más de 11 veces por

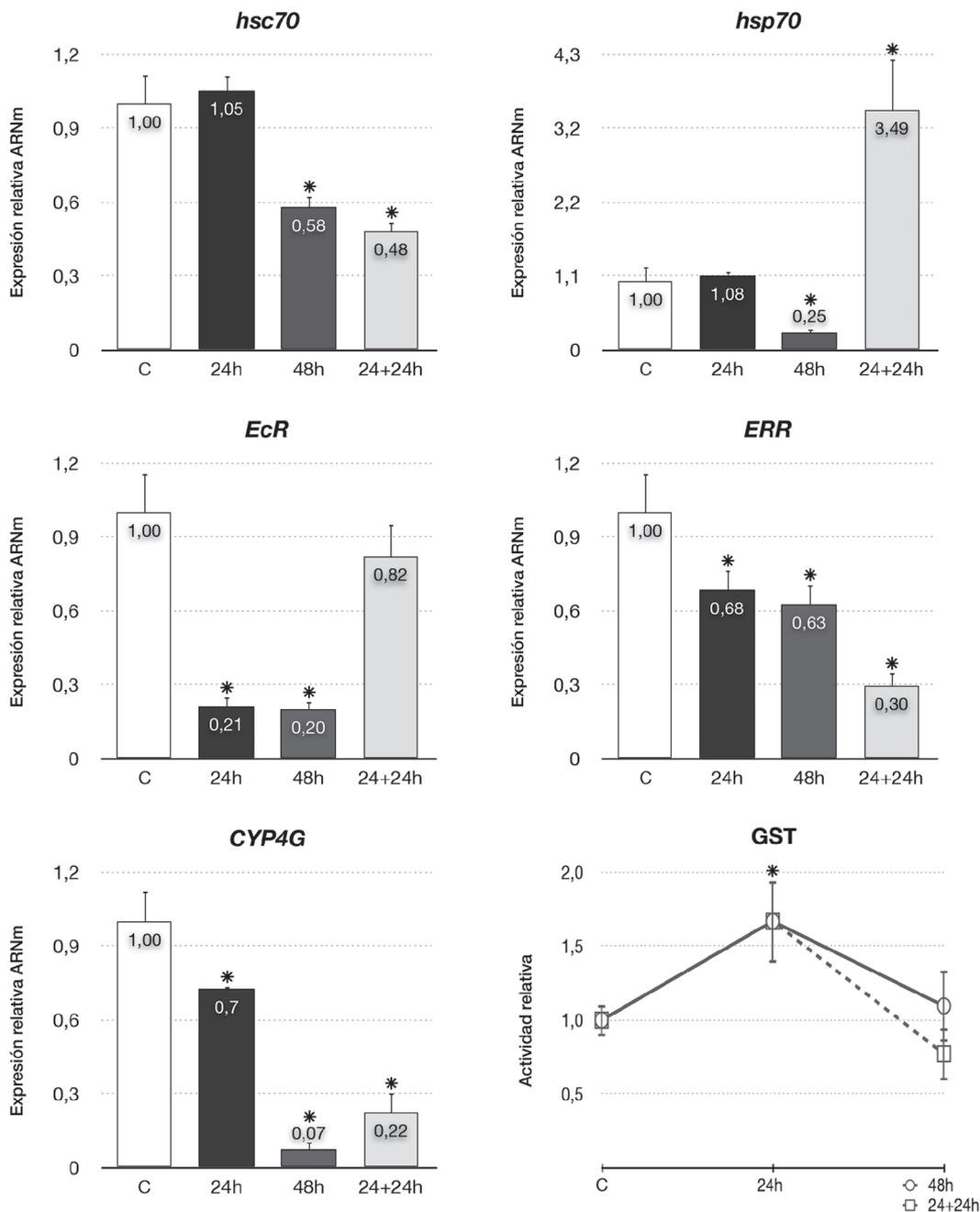


Figura 2. Análisis de la expresión génica (*hsc70*, *hsp70*, *EcR*, *ERR* y *CYP4G*) y la actividad enzimática (*GST*) de larvas de *C. riparius* expuestas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DEHP durante 24 y 48 horas, así como de larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: expresión relativa de ARNm ($M \pm SE$). * Diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

encima de los controles, y la incapacidad de las larvas de retornar a los valores de los controles 24 horas después de haber retirado el compuesto del medio. Por otro lado, los procesos de fase II sí tuvieron un comportamiento similar en los dos ftalatos, aunque en el caso del BBP la exposición más prolongada al compuesto llegó a reducir significativamente la actividad enzimática de GST en más de un 50%.

Por último, los ensayos de toxicidad retardada mostraron cómo la retirada del BBP del medio de cultivo provocó una fuerte inducción de la actividad de todos los genes analizados. Este hecho contrasta con la incapacidad de las larvas de reactivar estos mismos genes en

los tratamientos con DEHP, en los que sólo se activó *hsp70* y lo hizo con una intensidad tres veces menor que en el caso del BBP.

Discusión

Los potenciales efectos adversos sobre la fauna silvestre de una cada vez mayor cantidad de compuestos antropogénicos eliminados en el medio ambiente como residuos han cobrado gran importancia tanto en lo concerniente a la salud ambiental como en lo que respecta a los

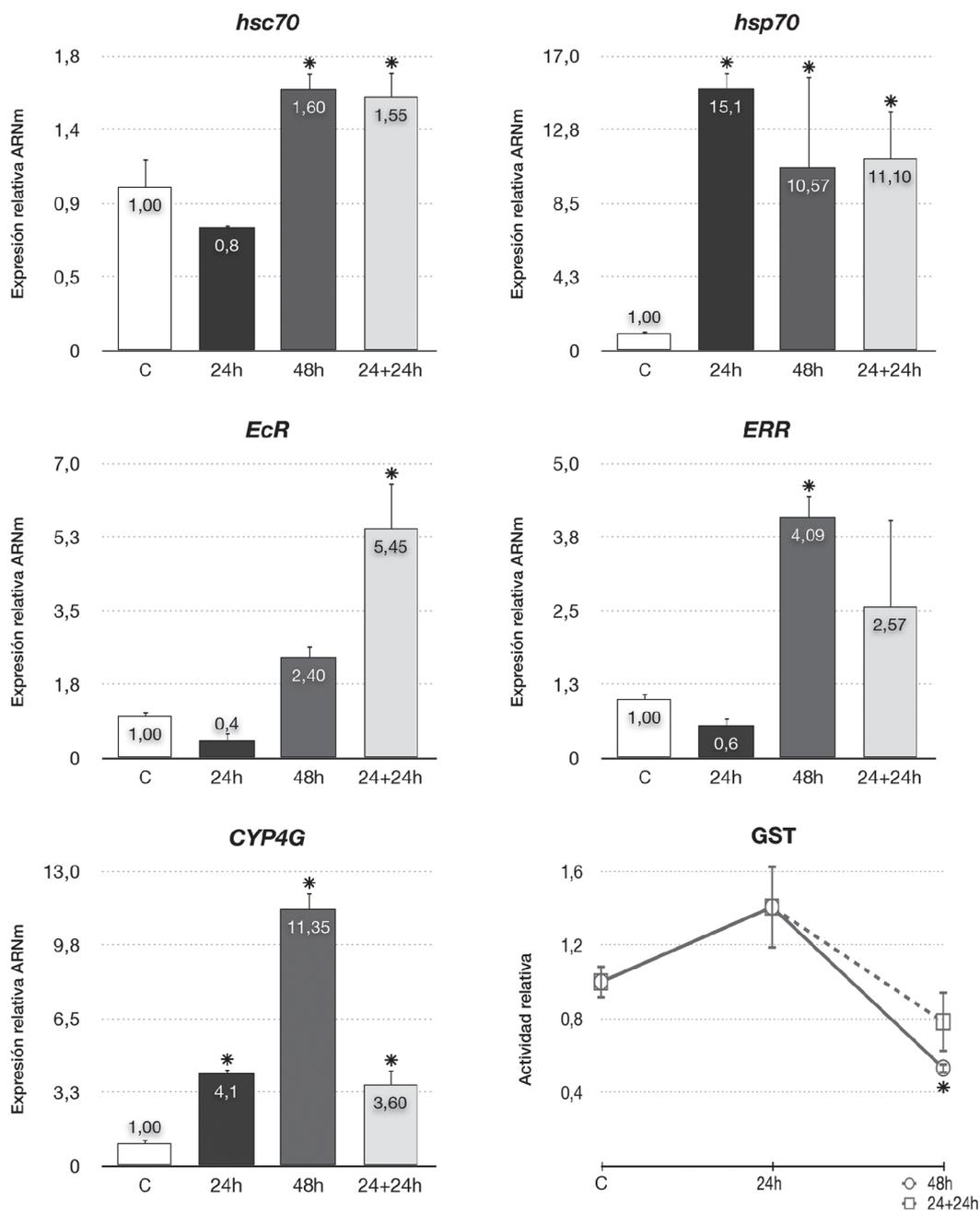


Figura 3. Análisis de la expresión génica (*hsc70*, *hsp70*, *EcR*, *ERR* y *CYP4G*) y la actividad enzimática (GST) de larvas de *C. riparius* expuestas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de BBP durante 24 y 48 horas, así como de larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: expresión relativa de ARNm ($M \pm SE$). * Diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

riesgos sobre la salud humana. Amén de la preocupación causada por las sustancias individuales, se consideran cada vez más relevantes los efectos producidos por las mezclas múltiples de sustancias, que suponen una aproximación más realista a las condiciones que se pueden encontrar en las aguas contaminadas. Un claro ejemplo de ello es la reciente clasificación de la contaminación atmosférica, entendida como una mezcla compleja de sustancias, en el Grupo 1 de los agentes evaluados por la IARC, como carcinógena en humanos [77].

Los organismos acuáticos están expuestos de manera permanente a gran variedad de contaminantes ambientales, muchos de los cuales se consideran persistentes. En estos ambientes la fauna bentónica

resulta de gran importancia, dado que representa una parte importante de la red alimenticia y además puede bioacumular determinados contaminantes, como metales, y servir de entrada de los mismos en la cadena trófica [78]. En este sentido, uno de los retos a los que se enfrenta la Ecotoxicología es llegar a comprender las respuestas biológicas de poblaciones naturales de organismos acuáticos, expuestas a una gran variedad de contaminantes químicos, así como mejorar las herramientas de control de la calidad del agua, capaces de detectar efectos subletales en comunidades biológicas expuestas a tóxicos. La aproximación más tradicional a estos efectos se ha centrado en el análisis de la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo y la reproducción, tanto en poblaciones naturales como en

organismos modelo en laboratorio [79,80]. Sin embargo, nuevas líneas de investigación focalizadas en parámetros moleculares revelan información acerca de dianas celulares específicas, capaces de arrojar luz sobre el modo de acción de los tóxicos analizados y los mecanismos de respuesta aguda y/o crónica de los organismos expuestos a estos compuestos en ambientes contaminados. Además, han demostrado ser herramientas de gran utilidad algunos marcadores bioquímicos, como la medida de distintas actividades enzimáticas [81,82], y distintos marcadores génicos capaces de aportar de manera rápida y sensible información sobre los compuestos de estudio [83]. Sin embargo, el escaso conocimiento de los genomas de invertebrados acuáticos hace que en la actualidad todavía sean pocos los estudios que tratan de analizar desde un punto de vista ecotoxicogenómico el comportamiento de estas poblaciones naturales en sus ambientes contaminados, habiéndose llevado a cabo los avances más importantes en distintas especies de vertebrados, especialmente peces [84].

Aunque el desarrollo de biomarcadores requiere un trabajo experimental previo en condiciones controladas de laboratorio, de manera que se puedan identificar respuestas específicas a determinados compuestos químicos, resulta necesaria su validación posterior en poblaciones naturales expuestas a una mezcla compleja de contaminantes antes de poder sacar conclusiones acerca de su utilidad en escenarios reales.

En el presente trabajo se han analizado por vez primera los efectos específicos de dos tóxicos, ftalatos en este caso, sobre larvas de *Chironomus riparius* que proceden de poblaciones naturales y que, previamente al contacto con estos tóxicos, tienen sus sistemas metabólicos adaptados a las condiciones físico-químicas del nicho ecológico en el que habitan.

Nuestros resultados muestran que la exposición de las larvas de campo a los dos ftalatos estudiados no alteró de manera significativa la tasa de supervivencia de las mismas, siendo el DEHP el más tóxico en las exposiciones más largas (48h). A pesar de esta falta de significación estadística, en el caso del BBP las larvas de poblaciones naturales resultaron ser más sensibles que las de cultivos de laboratorio, según resultados previos en los que los efectos sobre este parámetro comenzaban a aparecer a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, mil veces superior [33].

Los estudios de los distintos marcadores celulares seleccionados mostraron respuestas bien diferenciadas por parte de los dos ftalatos. De manera general, mientras el DEHP originó principalmente la represión de los genes analizados, el BBP tuvo precisamente el efecto contrario, provocando casi siempre una fuerte sobreexpresión de los mismos.

El análisis de la respuesta celular de estrés, bien caracterizada en *Chironomus* [77], resulta de gran interés dado que la familia de genes de choque térmico codifica para proteínas que pueden ser responsables de la supervivencia y adaptación de las células bajo condiciones adversas, como la exposición a xenobióticos [78], siendo las proteínas de 70 kDa unas de las evolutivamente más conservadas y contando con miembros tanto constitutivos como inducibles [79], como HSC70 y HSP70, respectivamente. La variación significativa de los niveles de expresión de *hsc70*, detectada tanto en las exposiciones más prolongadas a DEHP y BBP como en los estudios de la toxicidad retardada de ambos compuestos, resulta llamativa dado que tradicionalmente ha demostrado su condición de gen *housekeeping* [80] mostrando una robusta estabilidad ante múltiples situaciones de estrés. En este sentido, estos resultados chocan con los

de trabajos previos en *Chironomus* que confirman la habitual inalterabilidad de los niveles de *hsc70* ante situaciones de estrés ambiental [68] o exposiciones a múltiples xenobióticos [71-74], incluso a concentraciones cien mil veces más altas de estos dos mismos ftalatos [33,73]. Por otro lado, las variaciones del gen *hsp70* demuestran que ninguno de los compuestos desencadena una respuesta tradicional de choque térmico en las condiciones evaluadas, provocando el BBP una sobreexpresión mucho más marcada (más de 10 veces los valores del control) que la habitual en ese tipo de respuestas (alrededor de 4 veces [73]) y disminuyendo el DEHP los niveles de transcrito tras 48 horas de exposición, en lo que será la tendencia general de este compuesto para todas las dianas analizadas. Dado que la proteína HSP70 juega un importante papel en el correcto plegamiento del receptor de la ecdisona, estando en vertebrados involucrada junto con otras chaperonas en la estabilización y activación del receptor de la hormona esteroidea, es probable que las variaciones en los niveles de expresión de estos genes puedan traer consigo la alteración de la ruta hormonal mediada por ecdisona, al influir sobre el receptor de esta hormona [81].

Tanto el DEHP como el BBP se encuentran catalogados como contaminantes emergentes con capacidad de alterar el sistema endocrino a través de distintas vías, incluyendo la epigenética [2,3], habiendo demostrado ser tóxicos tanto para la reproducción como para el desarrollo. Los ecdisteroides como la ecdisona juegan un papel esencial en el desarrollo, el crecimiento, la reproducción y la embriogénesis en artrópodos [82,83]. Estudios previos han demostrado la capacidad de muchos contaminantes ambientales de actuar como agonistas o antagonistas de las hormonas esteroideas en invertebrados [84], pudiendo modular sus perfiles de expresión y produciendo así alteraciones en los mecanismos de regulación hormonal. Por otro lado, los receptores relacionados con estrógenos actúan como factores de transcripción dependientes de ligando y están implicados en importantes procesos metabólicos relacionados con el origen de distintos tipos de tumores y la regulación de la demanda energética, entre otros [85]. El análisis de la expresión de los genes *EcR* y *ERR* mostró una respuesta pareja del DEHP y el BBP tras las primeras 24 horas de exposición, caracterizada por una notable represión de ambas dianas, y un claro efecto antagónico en los estudios más prolongados. Así, mientras que en el caso del DEHP la represión se mantuvo tras 48 horas y los niveles de expresión no se recuperaron ni siquiera con la retirada del tóxico del medio, tanto la exposición durante 48 horas a BBP como los estudios de toxicidad retardada con este compuesto dispararon los niveles de estos genes, de manera especialmente llamativa en el caso del receptor de la ecdisona. Es posible que un efecto tóxico general de ambos ftalatos sea la causa del descenso de la actividad transcripcional de *EcR* a las 24 horas, mientras que los altos niveles detectados en el caso del BBP podrían deberse a la capacidad de este compuesto de imitar el comportamiento de la forma activa de la ecdisona (20E), mostrando de este modo un efecto disruptor endocrino en este modelo experimental, en consonancia con resultados previos obtenidos con cultivos de laboratorio [33].

Por último, ambos compuestos mostraron también claras diferencias en su comportamiento tóxico al estudiar sus efectos sobre el metabolismo de desintoxicación relacionado con el citocromo P450. La alteración de los sistemas enzimáticos que protegen a las células ante la exposición a sustancias perjudiciales puede condicionar el correcto funcionamiento de los procesos de eliminación de un tóxico tras su metabolización y la capacidad de una sustancia para bioacumularse, amén de que alteraciones en estos sistemas llevan

asociados daños celulares ante los que un organismo puede adaptarse, por ser leves o pasajeros, o bien sucumbir, cuando la homeostasis celular se ve seriamente comprometida. La monooxigenasa dependiente del citocromo P450 se ha detectado en todos los organismos examinados, de bacterias a mamíferos, y representa el sistema enzimático más importante en lo que a la desintoxicación de xenobióticos se refiere. En insectos, este sistema resulta crucial tanto en la regulación de los niveles de moléculas endógenas, como hormonas, ácidos grasos y esteroides, como en la biotransformación de xenobióticos y pesticidas [86]. Las enzimas P450 se encuentran asimismo en las rutas de biosíntesis de las hormonas ecdisteroideas y juvenil, las cuales juegan un papel fundamental en el crecimiento, el desarrollo y la reproducción de los insectos [87]. Este sistema enzimático ha demostrado ser inducible tras la exposición de los organismos a gran variedad de compuestos químicos, entre los que se incluyen algunas de las principales clases de contaminantes ambientales [86,88]. En el presente trabajo, el análisis de los niveles de expresión de *CYP4G* mostró claras diferencias entre los dos ftalatos evaluados. Por un lado, el DEHP produjo en todos los casos una fuerte represión en los niveles de expresión de este gen, induciendo un daño que las larvas no eran capaces de revertir en los estudios de toxicidad retardada y llegando a inhibir por completo este gen en los tratamientos más largos. Por otro lado, el BBP produjo una fuerte sobreexpresión del gen en todas las condiciones, evidenciando así la notable capacidad de este compuesto de activar el metabolismo de desintoxicación de fase I en las larvas de *Chironomus*.

Por su parte, los biomarcadores que emplean medidas de la actividad enzimática para detectar bajos niveles de contaminantes están siendo cada vez más utilizados en las evaluaciones del riesgo de ecosistemas acuáticos [89] y gracias a ellos es posible identificar la incidencia y los efectos de la exposición a xenobióticos, proporcionando una alerta temprana de sus potenciales efectos dañinos incluso en los niveles más altos de organización biológica [90]. Las glutatión S-transferasas constituyen una familia diversa de enzimas multifuncionales de desintoxicación de fase II, se han encontrado en casi todos los organismos vivos y son también un biomarcador bioquímico popular, capaz de detectar la presencia de diversos xenobióticos a partir de la medida de su inducción [91]. La actividad enzimática de GST sí se vio alterada de forma pareja por los dos ftalatos estudiados, destacando un aumento tras 24 horas de exposición que en tiempos más largos se tornó en falta de efecto o en descenso de actividad, llegando a ser éste último significativo tras 48 horas en presencia de BBP. En conjunto, por tanto, nuestros resultados parecen indicar que tanto DEHP como BBP son capaces de modular significativamente las respuestas de desintoxicación de fase I dependientes de citocromo P450, mientras afectan ligeramente a las de fase II en las que está involucrada la enzima GST.

Nuestros resultados confirman la necesidad de llevar a cabo estudios en diferentes poblaciones para conseguir definir con mayor exactitud las dianas de efecto que se ven alteradas por la exposición a estos compuestos, así como el tipo de respuesta que desencadenan en función de las circunstancias particulares de un escenario real, en el que las larvas están sometidas de forma crónica en mayor o menor grado a mezclas complejas de contaminantes.

Conclusiones

Nuestros resultados demuestran que exposiciones de larvas de *Chironomus riparius* a DEHP y BBP provocan alteraciones rápidas

en dianas relacionadas con la respuesta celular de estrés, la ruta hormonal y los mecanismos de desintoxicación. De manera general, ambos compuestos difieren en el efecto que provocan, especialmente en las exposiciones más prolongadas, y manifiestan su capacidad de desencadenar una respuesta tóxica retardada una vez que las larvas han dejado de estar en contacto con ellos. De especial relevancia son los resultados obtenidos en relación a su actividad disruptora endocrina, dado que ambos alteran la ruta hormonal de la ecdisona. Por último, este estudio con larvas de campo muestra diferencias con respecto a datos previos con larvas de laboratorio, tanto en la toxicidad de estos ftalatos como en el comportamiento de algunas dianas. Este hecho es de gran importancia ecotoxicológica y sugiere la necesidad de llevar a cabo estudios con diferentes poblaciones para alcanzar un conocimiento más completo de los efectos potenciales de un tóxico.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a un proyecto financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (CTM2012-37547).

Bibliografía

1. Andrady AL, Neal M a. (2009) Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364:1977–84; doi:10.1098/rstb.2008.0304.
2. NTP-CERHR (2003) NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Butyl Benzyl Phthalate (BBP). National Institutes of Health, Bethesda.
3. NTP-CERHR (2006) NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). National Institutes of Health, Bethesda.
4. Staples C, Peterson D, Parkerton T, Adams WJ (1997) The Environmental Fate of Phthalate Esters: A Literature Review. *Chemosphere* 35: 667–749.
5. Horn O, Nalli S, Cooper D, Nicell J (2004) Plasticizer metabolites in the environment. *Water Res.* 38:3693–8; doi:10.1016/j.watres.2004.06.012.
6. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk KO, et al (2009) A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364:2047–62; doi:10.1098/rstb.2008.0242.
7. ECHA (2008) Inclusion of substances of very high concern in the candidate list (Decision by the Executive Director). European Chemicals Agency, Helsinki.
8. ECHA (2008) Member State Committee Support Document for Identification of Benzyl butyl phthalate (BBP) as a Substance of Very High Concern.
9. ECHA (2008) Inclusion of substances of very high concern in the candidate list (Decision by the Executive Director). European Chemicals Agency, Helsinki.
10. FDA (2001) Safety Assessment of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices. United States Food and Drug Administration, Rockville.

11. IPCS (1992) Environmental Health Criteria 131. Diethylhexyl phthalate. International Programme on Chemical Safety, Geneva.
12. ECB (2008) Bis (2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) CAS No : 117-81-7 EINECS No : 204-211-0 Summary Risk Assessment Report. European Chemicals Bureau, Luxembourg.
13. Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE (2001) Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl)phthalate. *Environ. Health Perspect.* 109: 229–37.
14. Cammack JN, White RD, Gordon D, Gass J, Hecker L, Conine D, et al. (2003) Evaluation of reproductive development following intravenous and oral exposure to DEHP in male neonatal rats. *Int. J. Toxicol.* 22: 159–74.
15. Crocker JF, Safe SH, Acott P (1988) Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J. Toxicol. Environ. Health* 23:433–44; doi:10.1080/15287398809531126.
16. David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol. Sci.* 55:433–43; doi:10.1093/toxsci/55.2.433.
17. David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Toxicol. Sci.* 58:377–85; doi:10.1093/toxsci/58.2.377.
18. Magliozzi R, Nardacci R, Scarsella G, Carlo V Di, Stefanini S (2003) Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochem. Cell Biol.* 120:41–9; doi:10.1007/s00418-003-0543-2.
19. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, et al. (2000) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.* 58:339–49; doi:10.1093/toxsci/58.2.339.
20. Voss C, Zerban H, Bannasch P, Berger MR (2005) Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 206:359–71; doi:10.1016/j.tox.2004.07.016.
21. ATSDR (2002) Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
22. Herrero O, Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Carvajal López L, Peropadre A, Hazen MJ (2012) Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the Allium cepa test. *Mutat. Res.* 743: 20–4; doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.028.
23. Sharpe RM, Irvine DS (2004) How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 328: 447–51; doi:10.1136/bmj.328.7437.447.
24. Latini G, Felice C De, Presta G, Vecchio A Del, Paris I, Ruggieri F, et al. (2003) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 111: 1783–5.
25. Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, et al. (2009) Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 12:225–49; doi:10.1080/10937400903094091.
26. Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R (2002) Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil. Steril.* 78:1187–94; doi:10.1016/S0015-0282(02)04389-3.
27. Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M (2008) Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 50:37–49; doi:10.1016/j.yrtph.2007.09.004.
28. Carnevali O, Tosti L, Speciale C, Peng C, Zhu Y, Maradonna F (2010) DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. *M. Polymenised. PLoS One* 5:e10201; doi:10.1371/journal.pone.0010201.
29. Kim EJ, Lee SK (2004) Reduced viability of F1 egg ropes in *Chironomus riparius* exposed to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *J. Environ. Biol.* 25: 259–61.
30. Kwak IS, Lee W (2005) Endpoint for DEHP exposure assessment in *Chironomus riparius*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74:1179–85; doi:10.1007/s00128-005-0705-0.
31. Park K, Kwak I-S (2008) Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* 74:89–95; doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.041.
32. Lee S-M, Lee S-B, Park C-H, Choi J (2006) Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65: 1074–81; doi:10.1016/j.chemosphere.2006.02.042.
33. Planelló R, Herrero O, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2011) Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquat. Toxicol.* 105:62–70; doi:10.1016/j.aquatox.2011.05.011.
34. Park K, Kwak I-S (2012) Gene expression of ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius*: effects of endocrine disruptor chemicals and antibiotics. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 156:113–20; doi:10.1016/j.cbpc.2012.05.002.
35. Park K, Kwak I-S (2010) Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* 79:934–41; doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.002.
36. Park K, Kwak I-S (2009) Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 150:361–7; doi:10.1016/j.cbpc.2009.05.015.
37. Park K, Kwak I-S (2008) Expression of *Chironomus riparius* serine-type endopeptidase gene under di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) exposure. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 151: 349–54; doi:10.1016/j.cbpb.2008.08.004.
38. Park K, Kwak I-S (2009) Calponin gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Toxicol.* 24:555–62; doi:10.1002/tox.20463.
39. ECB (2007) European Union Risk Assessment Report - benzyl

- butyl phthalate (BBP). European Chemicals Bureau, Luxembourg.
40. Herrero O, Fernández JM, Hernández D, Montes P, Polo A, de la Peña E (2005) Mutagenicidad y ecotoxicidad de enmiendas orgánicas de suelos. *Rev. Toxicol.* 22: 1–4.
 41. Wibe AE, Billing A, Rosenqvist G, Jenssen BM (2002) Butyl benzyl phthalate affects shoaling behavior and bottom-dwelling behavior in threespine stickleback. *Environ. Res.* 89:180–7; doi:10.1006/enrs.2002.4360.
 42. Wibe AE, Fjeld E, Rosenqvist G, Jenssen BM (2004) Postexposure effects of DDE and butylbenzylphthalate on feeding behavior in threespine stickleback. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57:213–9; doi:10.1016/S0147-6513(03)00005-8.
 43. Ahmad R, Gautam AK, Verma Y, Sedha S, Kumar S (2014) Effects of in utero di-butyl phthalate and butyl benzyl phthalate exposure on offspring development and male reproduction of rat. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21:3156–65; doi:10.1007/s11356-013-2281-x.
 44. Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, et al. (2000) Development of a Reproductive Performance Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using Pair-Breeding Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 34:3003–3011; doi:10.1021/es991292a.
 45. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103: 582–7.
 46. Mankidy R, Wiseman S, Ma H, Giesy JP (2013) Biological impact of phthalates. *Toxicol. Lett.* 217:50–8; doi:10.1016/j.toxlet.2012.11.025.
 47. Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB (1998) Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 46:282–93; doi:10.1006/toxs.1998.2505.
 48. Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M (1998) Effects of Xenoestrogenic Environmental Pollutants on the Proliferation of a Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34:306–310; doi:10.1007/s002449900322.
 49. Sung H-H, Kao W-Y, Su Y-J (2003) Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquat. Toxicol.* 64:25–37; doi:10.1016/S0166-445X(03)00011-0.
 50. Liu Y, Guan Y, Yang Z, Cai Z, Mizuno T, Tsuno H, et al. (2009) Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology* 18:293–303; doi:10.1007/s10646-008-0283-0.
 51. Wang J-X, Xi Y-L, Hu K, Liu X-B (2011) Effect of butyl benzyl phthalate on life table-demography of two successive generations of cladoceran *Moina macrocopa* Straus. *J. Environ. Biol.* 32: 17–22.
 52. Kang J-H, Asai D, Aasi D, Katayama Y (2007) Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 37:607–25; doi:10.1080/10408440701493103.
 53. Soin T, Smagghe G (2007) Endocrine disruption in aquatic insects: a review. *Ecotoxicology* 16:83–93; doi:10.1007/s10646-006-0118-9.
 54. EPA (1996) Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1735 Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates, Freshwater. United States Environmental Protection Agency, Washington.
 55. EPA (1996) Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1790 Chironomid Sediment Toxicity Test. United States Environmental Protection Agency, Washington.
 56. EU (2011) Reglamento (UE) no 544/2011 de la Comisión, de 10 de junio de 2011, por el que se aplica el Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los requisitos sobre datos aplicables a las sustancias activas. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 11 de junio de 2011, L155, Luxembourg.
 57. EU (2012) Reglamento (UE) no 528/2012, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 27 de junio de 2012, L167, Luxembourg.
 58. Giesy JP, Rosiu CJ, Graney RL, Henry MG (1990) Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environ. Toxicol. Chem.* 9:233–248; doi:10.1002/etc.5620090214.
 59. Brown D, Thompson RS, Stewart KM, Croudace CP, Gillings E (1996) The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of the midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. *Chemosphere* 32:2177–2187; doi:http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(96)00128-2.
 60. Ankley GT, Schubauer-Berigan MK (1994) Comparison of techniques for the isolation of sediment pore water for toxicity testing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27; doi:10.1007/BF00214842.
 61. ECB (2008) European Union Risk Assessment Report - bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). European Chemicals Bureau, Luxembourg.
 62. Chappie DJ, Burton GA (1997) Optimization of in situ bioassays with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:559–564; doi:10.1002/etc.5620160323.
 63. Bleeker EA., Geest HG van der, Kraak MH., Voogt P de, Admiraal W (1998) Comparative ecotoxicity of NPAHs to larvae of the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 41:51–62; doi:10.1016/S0166-445X(97)00070-2.
 64. Tucker KA, Burton GA (1999) Assessment of nonpoint-source runoff in a stream using in situ and laboratory approaches. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2797–2803; doi:10.1002/etc.5620181221.
 65. Asselman J, Glaholt SP, Smith Z, Smagghe G, Janssen CR, Colbourne JK, et al. (2012) Functional characterization of four metallothionein genes in *Daphnia pulex* exposed to environmental stressors. *Aquat. Toxicol.* 110-111:54–65; doi:10.1016/j.aquatox.2011.12.010.
 66. Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76:160–202; doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015.
 67. Piña B, Barata C (2011) A genomic and ecotoxicological

- perspective of DNA array studies in aquatic environmental risk assessment. *Aquat. Toxicol.* 105:40–9; doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.006.
68. Laskowski R, Bednarska AJ, Kramarz PE, Loureiro S, Scheil V, Kudłek J, et al. (2010) Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors--a meta-analysis and case studies. *Sci. Total Environ.* 408:3763–74; doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.043.
 69. Planelló R, Servia MJ, Gómez-Sande P, Herrero O, Cobo F, Morcillo G (2013) Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *Chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. *Environ. Toxicol.*; doi:10.1002/tox.21893.
 70. OECD (2004) Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
 71. Park K, Kwak I-S (2009) Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150:361–7; doi:10.1016/j.cbpc.2009.05.015.
 72. Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2010) Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci Total Environ* 408:1598–603; doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.004.
 73. Morales M, Planelló R, Martínez-Paz P, Herrero O, Cortés E, Martínez-Guitarte JL, et al. (2011) Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 153:150–8; doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.003.
 74. Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2008) The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 71:1870–6; doi:10.1016/j.chemosphere.2008.01.033.
 75. Park K, Kwak I-S (2010) Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* 79:934–41; doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.002.
 76. Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2012) Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 155:333–43; doi:10.1016/j.cbpc.2011.10.001.
 77. Morcillo G, Diez JL, Botella LM (1994) Heat shock activation of telomeric sequences in different tissues of *Chironomus thummi*. *Exp Cell Res* 211:163–7; doi:10.1006/excr.1994.1072.
 78. Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci.* 86:377–84; doi:10.1016/j.lfs.2009.12.015.
 79. Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670–84; doi:10.1007/s00018-004-4464-6.
 80. Liao Y, Tang L (2014) The critical roles of HSC70 in physiological and pathological processes. *Curr. Pharm. Des.* 20:101–7.
 81. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U (2003) Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl. Chem.* 75:2207–2218; doi:10.1351/pac200375112207.
 82. Sekimoto T, Iwami M, Sakurai S (2006) Coordinate responses of transcription factors to ecdysone during programmed cell death in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 15:281–92; doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00641.x.
 83. Lafont R, Mathieu M (2007) Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16:109–30; doi:10.1007/s10646-006-0113-1.
 84. Janer G, Porte C (2007) Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology* 16:145–60; doi:10.1007/s10646-006-0110-4.
 85. Bianco S, Sailland J, Vanacker J-M (2012) ERRs and cancers: effects on metabolism and on proliferation and migration capacities. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 130:180–5; doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.014.
 86. Scott JG (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:757–77.
 87. Feyereisen R (1999) Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44:507–33; doi:10.1146/annurev.ento.44.1.507.
 88. Hoffman DJ, Rattne BA, Burton Jr. GA, Cairns Jr., J (1995) *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton.
 89. Callaghan A, Fisher TC, Grosso A, Holloway GJ, Crane M (2002) Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52:128–33; doi:10.1006/eesa.2002.2160.
 90. McCarthy J, Shugart L (1990) Biological markers of environmental contamination. En *Biomarkers of Environmental Contamination* (J. McCarthy, L. Shugart eds.), pp. 3–14. Lewis Publishers, Boca Raton.
 91. Lagadic L, Caquet T, Ramade F (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (5). *Invertebrate populations and communities. Ecotoxicology* 3:193–208; doi:10.1007/BF00117084.

Cytotoxic and interactive effects of zearalenone, α -zearalenol and β -zearalenol and formation of metabolites in HepG2 cells

Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz MJ

Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain

Recibido 29 julio de 2014 / Aceptado 29 octubre de 2014

Abstract: Zearalenone (ZEA) is a secondary metabolite of *Fusarium* fungi. ZEA is a non-steroidal estrogenic mycotoxin which is rapidly absorbed and metabolized to α -zearalenol (α -ZOL) and β -zearalenol (β -ZOL) in the liver; therefore mixtures of these mycotoxins may be simultaneously present in biological systems and cause human health risk. The objectives of this study were: a) to compare the cytotoxicity of ZEA, α -ZOL and β -ZOL alone or in combination on human hepatoma (HepG2) cells using the MTT assay after 24, 48 and 72h of exposure, and b) to evaluate the interactions of these mycotoxins mixtures in HepG2 cell lines by the isobologram analysis. The IC_{50} values obtained for individual mycotoxins range from 70.0 to >100.0 μ M, from 20.6 to 26.0 μ M and from 38.4 to >100.0 μ M in HepG2 cells for ZEA, α -ZOL and β -ZOL, respectively. Isobologram analysis provides a combination index (CI) value to determine the type of interaction that occurs. The interactions of ZEA and its metabolites showed slightly synergism (CI from 0.34 ± 0.10 to 0.69 ± 0.22) followed by additive effect (CI from 0.97 ± 0.20 to 2.61 ± 2.15) and turned into antagonism (CI from 1.29 ± 0.18 to 7.77 ± 2.27). The concentration of ZEA and its metabolites was determined with liquid chromatography coupled to the mass spectrometer detector-linear ion trap (LC-MS-LIT). No conversion of ZEA in α -ZOL and β -ZOL was detected. However other degradation products were detected.

Keywords: zearalenone, HepG2 cells, interactive effect, isobolas, metabolites

Resumen: Citotoxicidad, formación de metabolitos e interacción entre zearalenona, α -zearalenol y β -zearalenol en células HepG2.

La zearalenona (ZEA) es un metabolito secundario producido por hongos del género *Fusarium*. ZEA es una micotoxina estrogénica no esteroidea que se metaboliza rápidamente en el hígado a α -zearalenol (α -ZOL) y β -zearalenol (β -ZOL); por lo tanto, mezclas de estas micotoxinas pueden estar presentes simultáneamente en un sistema biológico y causar un riesgo para la salud humana. Los objetivos de este estudio fueron: a) comparar la citotoxicidad de la ZEA, α -ZOL y β -ZOL de forma individual y en combinación en células hepáticas humanas (HepG2) usando el ensayo MTT tras una exposición de 24, 48 y 72h y b) evaluar la interacción de las mezclas de estas micotoxinas en células HepG2 mediante el análisis de las isobolas. Los valores de IC_{50} obtenidos en células HepG2 con las micotoxinas individuales van desde 70,0 a > 100,0 μ M, de 20,6 a 26,0 μ M y de 38,4 a > 100,0 μ M para ZEA, α -ZOL y β -ZOL, respectivamente. El método de las isobolas proporciona el índice de combinación (IC) con el que se determina el tipo de interacción que se produce entre las micotoxinas. La interacción entre la ZEA y sus metabolitos mostró un ligero sinergismo (CI de $0,34 \pm 0,10$ a $0,69 \pm 0,22$), seguido de efecto aditivo (CI de $0,97 \pm 0,20$ a $2,61 \pm 2,15$) que se acabó en antagonismo

(CI de $1,29 \pm 0,18$ a $7,77 \pm 2,27$) dependiendo de la concentración y tiempo de exposición. La concentración de ZEA y sus metabolitos se determinó con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones lineal (LC-MS-LIT). No se detectó ninguna conversión de ZEA en α -ZOL y β -ZOL. Sin embargo se detectaron otros productos de degradación.

Palabras clave: Zearalenona, células HepG2, interacción, isobolas, metabolitos

Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi. There are more than 300 mycotoxins and their effects have not been completely characterized [1]. Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced as a secondary metabolite of *Fusarium* fungi [2-3]. ZEA is metabolized in the liver in α -zearalenol (α -ZOL) and β -zearalenol (β -ZOL) by 3α -hydroxysteroid dehydrogenase and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, respectively [4]. ZEA biotransformation also can occur in fungi and plants, which are involved in the aromatic ring and aliphatic group [3].

ZEA is hepatotoxic which can develop into hepatocarcinoma. Besides, ZEA is hematotoxic, immunotoxic and genotoxic [5-6]. However, reproductive system is the target organ of ZEA and its metabolites. They produced endocrine disruption which causes estrogenic effects. These alterations are due to the ability of ZEA and its metabolites of binding to the estrogenic receptors (ER) [4,7,8].

The Food and Agriculture Organization (FAO) estimates that approximately 25% of world production of food is contaminated with at least one mycotoxin [1,9]. Human and animals are exposed simultaneously to several *Fusarium* mycotoxins for different reasons: 1- *Fusarium* fungi are able to produce more than one mycotoxin; 2- food and feed can be contaminated by several fungi simultaneously and 3- a complete diet is made up of different commodities [10]. The natural co-occurrence of mycotoxins in food and feed is a cause of concern because the exposure to mixture of mycotoxins may be potent and causes more damage to human health than mycotoxins alone [10-12]. However, the ability of ZEA to metabolize into α -ZOL and β -ZOL can produce mixtures of these mycotoxins in the organism which may cause an increase in the toxicity produced by these mycotoxins. On the other hand, the interactive effect of the mycotoxins is poorly understood and the data of these mixtures are limited, besides the health problems of the exposure to the combination mycotoxins are unknown. So, to study the interaction between mycotoxins is needed; besides it is known that *Fusarium* mycotoxins can produce synergism and additive [13-17] effects.

* e-mail: Elena.Tatay@uv.es

The cytotoxicity assays have been increasing since they are faster to apply, cheaper, easier to maintain, and they are more quantitative methods than *in vivo* assay. Moreover, the experimental conditions can be controlled easily; they are widely reproducible and avoid the ethical problems associated with *in vivo* experimentation [18]. There are a lot of studies about the cytotoxicity of ZEA tested alone, but only a few studies about combined effects of ZEA or its metabolites [1,5]. And only few of these authors used the isobologram method [14,17].

Due to ZEA is metabolized by the liver into α -ZOL and β -ZOL, the aim of study was to determinate the cytotoxic effects of ZEA and its metabolites tested alone and in combination in HepG2 cells after 24, 48 and 72h of incubation. The type of interaction of these mycotoxins in the mixtures is also investigated. HepG2 cells, which posse metabolic capacity, were selected to prove if this cell line can metabolize ZEA in its two metabolites or even other different.

Materials and methods

1 Reagents and equipment

The reagent grade chemicals and cell culture components used, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicillin, streptomycin, HEPES, 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl, 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), phosphate buffer saline (PBS), glucose, dimethyl sulfoxide (DMSO), and analytical standard of mycotoxins were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Mycotoxins selected were ZEA (318.36 g/mol), α -ZOL (320.38 g/mol) and β -ZOL (320.38 g/mol). Fetal calf serum (FCS) was from Cambrex Company (Belgium). Deionized water (resistivity <18 MX cm) was obtained using a purification system Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). All other reagents were of standard laboratory grade. Stock solutions of mycotoxins were prepared in methanol and maintained at -20°C in the dark. The final concentrations tested were achieved by adding the culture medium with mycotoxins and the final methanol concentration in medium was 1% (v/v).

For analytical assay, a LC coupled to a mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX Q TRAP TM linear ion trap mass spectrometer, Concord, Ontario, Canada) with A Gemini (150 x 2.0 mm, 5 μ m) Phenomenex (Torrance, California) column was used.

2. Cell culture and treatment

Cells were grown at 37°C in 9 cm² polystyrene tissue culture dishes. HepG2 cells were grown using DMEM medium. Media were supplemented with 25mM HEPES buffer (pH 7.4), 10% FCS, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. The incubation conditions were 5% CO₂ at 37°C and 95% air atmosphere at constant humidity. Absence of mycoplasma was checked routinely using the Mycoplasma Stain Kit (Sigma-Aldrich, St Louis Mo. USA).

3. Cytotoxicity of mycotoxins

Cytotoxicity assays were determined by the MTT assay performed as described by Ruiz [19].

Mammalian HepG2 cells were cultured in 96-well microplates by adding 200 μ L/well of a suspension of 2 x 10⁴ cells/well. After cells reached 90% confluence, the culture medium was removed and was added fresh medium containing the serial dilution of each mycotoxin: ZEA (from 12.5 to 100 μ M), α -ZOL (from 6.5 to 100 μ M) and β -ZOL (from 6.5 to 100 μ M) incubated during 24, 48 and 72 h. Then, the medium was removed and cells of each well received fresh medium containing 50 μ l MTT. After 4 h of incubation at 37°C under darkness, the resulting formazan was solubilized in DMSO. The absorbance

was measured at 570 nm using an automatic ELISA plate reader (MultiskanEX, LabSystem, Helsinki, Finland). The IC₅₀ values were obtained from full concentration response curve.

To carry out the cytotoxicity assay with the mixtures, HepG2 cells were incubated with several dilutions of each binary and tertiary combinations of ZEA, α -ZOL and β -ZOL. Mixtures were prepared as follow: ZEA + α -ZOL and ZEA + β -ZOL at constant 2:1 ratio, α -ZOL + β -ZOL at constant 1:1 ratio and ZEA + α -ZOL + β -ZOL at constant 2:1:1 ratio. Five dilutions of each mycotoxin combinations (ZEA 12.5-100; α -ZOL 6.25-100 and β -ZOL 6.25-100) plus a control were tested in three independent experiments.

4 Interactions of mycotoxins

The median-effect/combination index (CI)-isobologram equation by Chou [20] and Chou and Talalay [21] was used to analyzed the results which is based on the median-effect principle (mass-action law) that demonstrates that there is an univocal relationship between dose and effect independently of the number of substrates or products and of the mechanism of action or inhibition. The CI index was calculated by the equation:

$${}^n(CI)_x = \frac{\sum_{j=1}^n (D_j)/(D_x)_j - (D_x)_{1-n} \{ [D]_j / \sum_{j=1}^n [D] \}}{(D_m)_j \{ (fax)_j / [1-(fax)_j] \}^{1/m_j}}$$

Where ${}^n(CI)_x$ is the combination index for n compounds (e.g., mycotoxins) at x% inhibition (e.g., proliferation inhibition); $(D_x)_{1-n}$ is the sum of the concentration of n compounds that exerts x% inhibition in combination, $\{ [D]_j / \sum_{j=1}^n [D] \}$ is the proportionality of the concentration of each of n compounds that exerts x% inhibition in combination; and $(D_m)_j \{ (fax)_j / [1-(fax)_j] \}^{1/m_j}$ is the concentration of each compound alone that exerts x% inhibition. The result from this equation, CI < 1, = 1, > 1 indicates synergism, additive or antagonism effect, respectively. The types of interaction shaped by the combinations of ZEA and its metabolites were assessed by isobologram analysis using CalCusyn software (Biosoft, Cambridge, UK)

5 Determination of ZEA, α -ZOL, β -ZOL and their degradation products by LC-MS-LIT

The determination of ZEA and its metabolites on HepG2 cells was carried out using a liquid chromatography coupled to linear ion trap mass spectrometry (LC/MS/LIT). Ten thousand cells per cm² were plated in 9 cm² polystyrene tissue culture dishes with culture medium and grown to confluence overnight. Fifty μ M of ZEA, α -ZOL and β -ZOL were added and incubated for 24 and 48 h. After, the medium and cells were collected extracted and analyzed by LC/MS/LIT. Cells were collected in an eppendorf tube, 1 μ l of growth medium was added and ultrasonicated during 3h for breaking the cells. After that, an extraction of mycotoxins with ethylacetate was made and the extract was dried in turbobap and finally redissolved with 1ml methanol. Respect to the growth medium, the same extraction procedure was performed for mycotoxins.

LC conditions were set up using a constant flow at 0.3 mL/min, with water at 0.1% of formic acid (HCOOH) (phase A) and acetonitrile at 0.1% of HCOOH (phase B) as mobile phases in gradient condition were used. The gradient employed was: 0-5 min-5% B, 15-25 min-90% B, 35-40 min-5% B. The instrument was configured in the positive ion electrospray mode using the following parameters: cone voltage 40 V, capillary voltage 3.80 kV, source temperature 350°C,

desolvation temperature 270°C and collision gas energy 5 eV. The analyses of the ZEA, α -ZOL and β -ZOL were carried out employing the technique of LC-MS-LIT with the following procedure: Characterization of the compound isolated with the modality of enhanced resolution scan, using the m/z range from 300 to 350 Da to obtain the general spectra of the degradation compound; The utilization of the mass spectrometer associated at the detection with the LIT, utilized in this modality permitted us to obtain a good characterization of the compounds isolated [22]. The method, for the detection and quantification of the mycotoxins targeted in this study was validated as a quantitative confirmatory method according to the EU Commission Decision, 2002/657/EC [23] and the parameters taking into account for this purpose were: instrumental linearity, accuracy, precision (repeatability and reproducibility) and sensitivity. Linearity was evaluated using the standard calibration curves that were constructed for each mycotoxin by plotting the signal intensity versus the analyte concentration and the internal standard (I.S.) and obtaining the area ratios (area analyte/area internal standard). Calibration curves were constructed from the peak area ratio of each analyte. The accuracy was evaluated through the calculation of individual compound recoveries. Recovery experiments were conducted at two different levels for each matrix, one at limits of quantification (LQs) and the other at 10 times LQs, added before the corresponding extraction procedure. Intra-day precision was assessed by calculating the relative standard deviation (RSDr), calculated from results generated under repetition conditions of six determinations per concentration in a single day. Inter-day precision was calculated by the relative standard deviation (RSDR) calculated from results generated under reproducibility conditions by one determination per concentration for 6 days. Sensitivity was evaluated by the limit of detection (LD) and LQ values.

Results

1 Cytotoxicity produced by individual mycotoxins

The concentration-response curves of individual mycotoxins in HepG2 cells are shown in Figure 1. It can be observed that ZEA and metabolites inhibited cell growth in dose and time dependent manner.

The IC_{50} values, observed in Table 1, demonstrate that at 24h α -ZOL showed the lowest IC_{50} value, whilst is maintained over time. ZEA and β -ZOL showed similar IC_{50} values at 24h. But, at 48 and 72h β -ZOL shows lower IC_{50} than ZEA

2 Cytotoxicity and interactions produced by mycotoxins combination

Figure 2 shows the concentration-response curves of mixtures of mycotoxins in the HepG2 cells at 24, 48 and 72 h of exposure.

In the combination of ZEA + α -ZOL (Fig. 2), at 24h of exposure, there was a decrease in cell viability of approximately 20% at the highest concentration tested in combination, against ZEA individually tested. After 48 h of exposure, there was a decrease of approximately 10% and 20% at the highest concentrations tested in combinations, against α -ZOL and ZEA tested alone respectively. While, after 72h of exposure, the cell viability was reduced approximately 40% for this combination when compared with individual ZEA, and the reduction of the viability was 30% respect to α -ZOL tested alone.

For the combination of ZEA + β -ZOL at 24 h of exposure a decreased 27% in cell viability was observed respect to β -ZOL individually tested. After 48h and 72h of exposure, this combination reduces the cell viability, approximately 30% respect to the mycotoxins tested

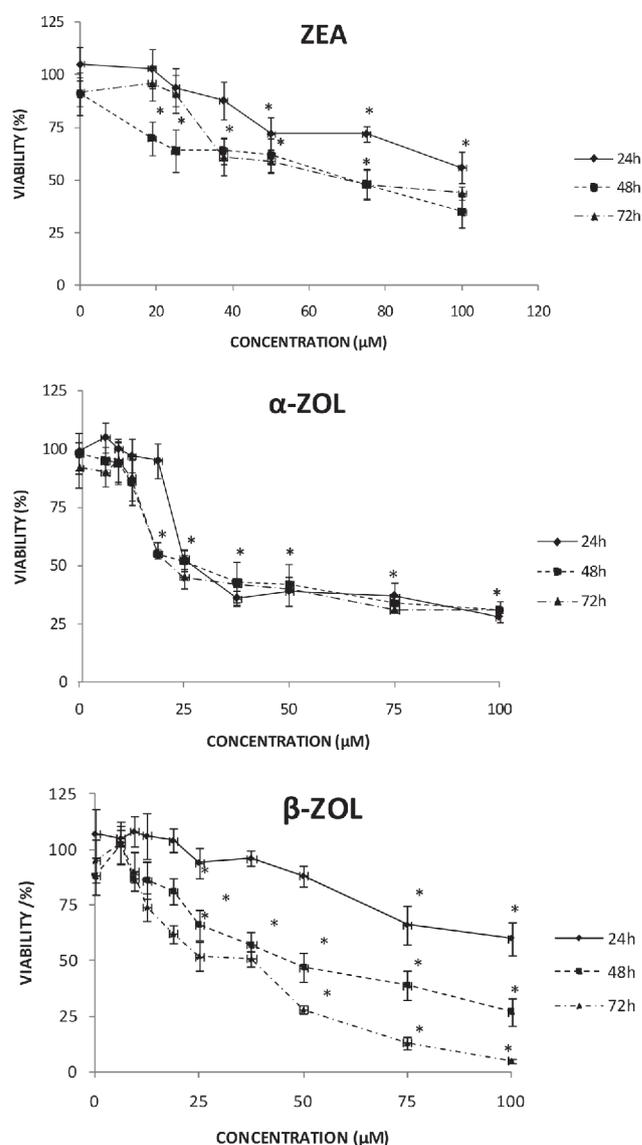


Figure 1. Concentration-response curves for individual mycotoxins on HepG2 cells after 24 (◆), 48 (■) and 72 h (▲) of exposure. Each point represents the mean value of at least three experiments. Data are expressed as mean value \pm SD (% of control). $p \leq 0.05$ (*) indicates a significant difference from control.

Table 1. IC_{50} values of ZEA, α -ZOL and β -ZOL obtained on HepG2 cells, after 24, 48 and 72h of exposure.

Mycotoxin	IC_{50} (μ M)		
	time (h)		
	24	48	72
ZEA	>100	71.30 \pm 5.70	70.00 \pm 5.70
α -ZOL	27.00 \pm 4.00	25.50 \pm 4.20	20.60 \pm 4.50
β -ZOL	>100	45.00 \pm 5.56	38.40 \pm 3.47

individually (Figure 2).

The combination α -ZOL + β -ZOL (Fig. 2), at 24h of exposure showed a decrease in cell viability about 60% and 10% at the highest concentration tested compared to the viability of HepG2 cells exposed to β -ZOL and α -ZOL alone, respectively. Similarly, at 48 and 72h a decrease in cell viability at the highest concentration tested of

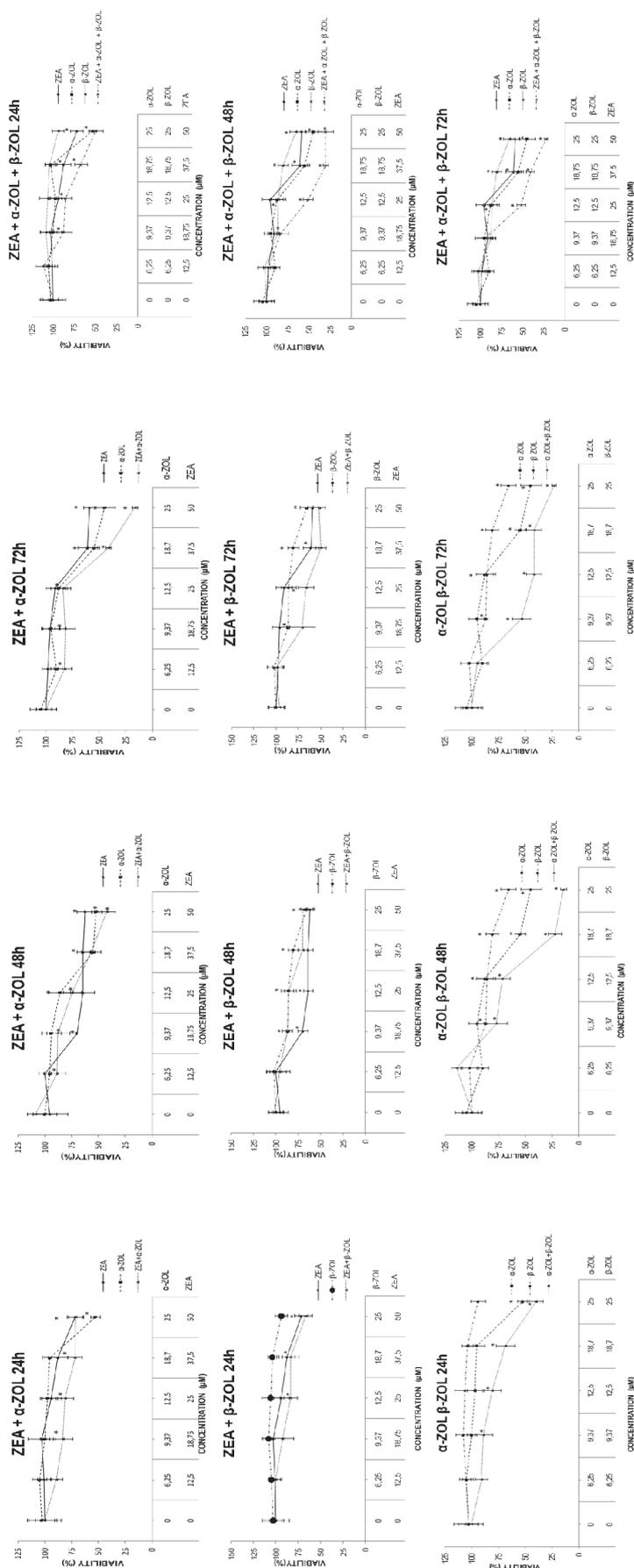


Figure 2. Concentration-response curves for individual ZEA (—◆—), α -ZOL (---■---), β -ZOL (---*---) and tertiary combinations (---*---) binary combinations (---*---) and tertiary combinations (---*---) of them in HepG2 cells after 24, 48 and 72 h of exposure. Concentration-response curves were fitted by non-linear regression. Data are expressed as mean value \pm SD of independent experiments (n=3). $p \leq 0.05$ (*) represent significant difference from control.

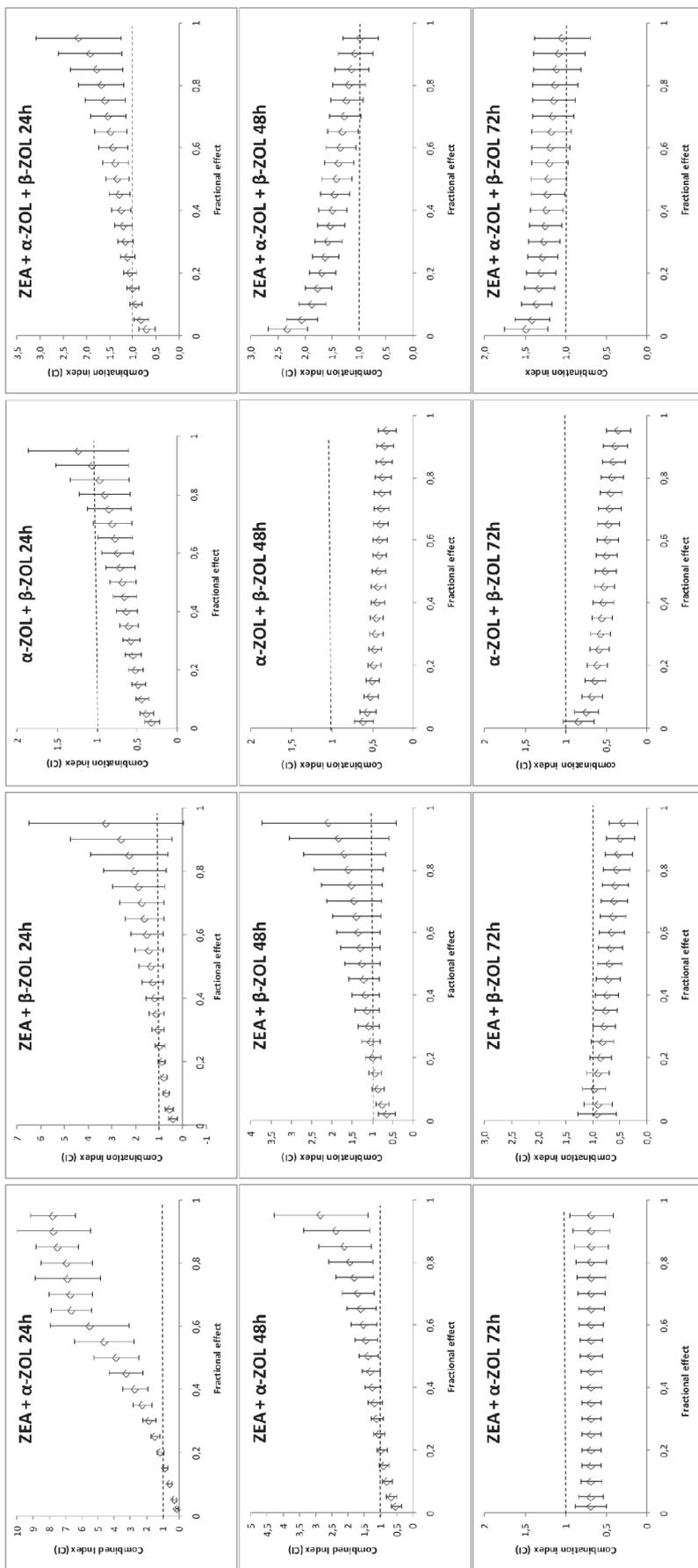


Figure 3. Combination index (CI)/fractional effect curve as described by Chou and Talalay model for HepG2 cell exposed to ZEA, α -ZOL and β -ZOL binary and tertiary combinations. Each point represents the CI \pm SD at a fractional effect as determined in our experiments. The dotted line indicates additivity, the area under the dotted line synergy, and the area above of the dotted line antagonism. HepG2 cells were exposed during 24, 48 and 72 h with ZEA + α -ZOL and ZEA + β -ZOL at molar ratio of 2:1; α -ZOL + β -ZOL at molar ratio of 1:1 (equimolar proportion) and ZEA + α -ZOL + β -ZOL at molar ratio of 2:1:1.

approximately of 30% and 50% was observed compared to α -ZOL and β -ZOL tested alone, respectively.

Figure 2 shows the concentration-response curves for the tertiary combination of mycotoxins at 24, 48 and 72h of exposure on HepG2 cells. At 24h of exposure, cell viability decreased approximately 15% and 40% compared to the β -ZOL and ZEA individually tested, respectively. After 48 h of exposure, the cell viability decreased 30% compared to β -ZOL and ZEA tested individually and approximately 15% respect to α -ZOL tested individually. At 72 h of exposure, the cell viability of tertiary combination decreased 35% compared to the ZEA and β -ZOL and 20% respect to α -ZOL tested alone.

The isobologram assay was used to determine the type of interaction

Table 2. The parameters m , Dm and r are the antilog of x -intercept, the slope and the linear correlation coefficient of the median-effect plot, which signifies the shape of the dose-effect curve, the potency (IC_{50}), and the conformity of the data to the mass-action law, respectively. Dm and m values are used for calculating the CI value ($CI < 1$, $=1$, and > 1 indicate synergism (Syn), additive effect (Add), and antagonism (Ant), respectively). IC_{25} , IC_{50} , IC_{75} and IC_{90} are the doses required to inhibit proliferation 25, 50, 75 and 90%, respectively. CalcuSyn Software provides automatically the IC_{25} , IC_{50} , IC_{75} , IC_{90} values.

MYCOTOXIN	TIME (h)	Dm (μ M)	m	r	CI VALUES			
					CI_{25}	CI_{50}	CI_{75}	CI_{90}
ZEA	24h	87.03020	3.27969	0.86944				
	48h	63.41079	0.77688	0.91966				
	72h	72.74993	1.91325	0.87516				
α -ZOL	24h	53.27594	3.30527	0.86834				
	48h	24.51993	2.28790	0.97890				
	72h	37.87019	1.37203	0.90647				
β -ZOL	24h	110.3766	2.78883	0.93588				
	48h	45.84811	2.11253	0.85039				
	72h	39.41671	2.18916	0.77212				
ZEA + α -ZOL	24h	186.63	0.85	0.95826	1.50 ± 0.27 Ant	3.89 ± 1.38 Ant	6.90 ± 2.00 Ant	7.77 ± 2.27 Ant
	48h	65.75	1.81	0.96024	1.05 ± 0.17 Add	1.37 ± 0.30 Add	1.80 ± 0.57 Ant	2.36 ± 1.07 Ant
	72h	32.95	3.30	0.96332	0.68 ± 0.11 Syn	0.68 ± 0.14 Syn	0.68 ± 0.17 Syn	0.68 ± 0.22 Syn
ZEA + β -ZOL	24h	84.66	1.61	0.92582	0.97 ± 0.20 Add	1.35 ± 0.51 Add	1.88 ± 1.10 Add	2.61 ± 2.15 Add
	48h	78.74	2.04	0.93590	1.05 ± 0.17 Add	1.26 ± 0.42 Add	1.52 ± 0.75 Add	1.83 ± 1.22 Add
	72h	43.37	6.05	0.82670	0.82 ± 0.20 Add	0.69 ± 0.22 Syn	0.58 ± 0.24 Syn	0.49 ± 0.25 Add
α -ZOL + β -ZOL	24h	24.57	1.91	0.95791	0.54 ± 0.09 Syn	0.68 ± 0.27 Syn	1.06 ± 0.45 Add	1.06 ± 0.45 Add
	48h	15.20	4.40	0.96730	0.46 ± 0.08 Syn	0.38 ± 0.09 Syn	0.34 ± 0.09 Syn	0.34 ± 0.10 Syn
	72h	18.43	5.15	0.90667	0.59 ± 0.12 Syn	0.44 ± 0.13 Syn	0.44 ± 0.13 Syn	0.38 ± 0.14 Syn
ZEA + α -ZOL + β -ZOL	24h	52.68	2.08	0.97732	1.11 ± 1.15 Add	1.33 ± 0.25 Add	1.60 ± 0.42 Ant	1.92 ± 0.68 Ant
	48h	55.56	5.34	0.96128	1.62 ± 0.24 Ant	1.41 ± 0.26 Ant	1.22 ± 0.29 Add	1.07 ± 0.29 Add
	72h	47.83	3.81	0.96892	1.29 ± 0.18 Ant	1.21 ± 0.22 Add	1.14 ± 0.26 Add	1.08 ± 0.31 Add

3 Degradation of ZEA and metabolites generated

The separation of ZEA and its metabolites was achieved by LC/MS/LIT. The linearity in LC-MS/MS was obtained in triplicate by spiking 6 concentrations (1, 10, 50, 100, 250 and 500 μ M). The linear regression coefficient of calibration curves showed a correlation coefficient (r^2) higher than 0.992. Recovery experiments were conducted at two different levels, one between 5 and 50 μ M (LQs) and the other between 50 and 500 μ M (10 times LQs). In both cases, mycotoxins added before the corresponding extraction procedure evidenced a recovery ranged from 75 to 99%. The values of intra-day precision ($n=6$) and inter-day precision ($n=6$) were inferior to 10% and 14%, respectively. Sensitivity was evaluated by LD and LQ values. The LD was estimated from blank extract, spiked with decreasing concentrations of the analytes. The response of the mycotoxin peak was equal to three times the response of the blank sample ($n=20$). Once evaluated, three samples were spiked at the estimated levels and extracted according to the proposed procedure. The LD and LQ evidenced for the mycotoxins studied ranged from 1 to 5 μ M.

To determine the metabolic capacity of HepG2 cells on ZEA and its metabolites, the HepG2 cells were exposed to 50 μ M of each

that occurs when mycotoxins are in combination (Fig. 3 and Table 2). At 24h and 48h the ZEA + α -ZOL combination shows antagonism effect at high fractions affected and synergism at low fractions affected. However, at 72h of exposure synergic effect was observed independently of the fractional effect. The mixture of ZEA and β -ZOL showed synergic effect at lower fractional effect and additive effect at higher fractional effect. However the effect was reversed at 72h of exposure. Synergic effects at all time and concentrations tested of exposure for α -ZOL + β -ZOL were demonstrated (Fig. 3 and Table 2). The tertiary combination (ZEA + α -ZOL + β -ZOL) showed antagonist effect at lower fractional effect which torn into additive effect at higher fractional effect at 48 and 72h of exposure.

mycotoxins during 24 and 48h. To detect the metabolic change of ZEA, α -ZOL and β -ZOL, the growth medium of the cells exposed to these mycotoxins was collected and injected in the LC-MS-LIT. The growth medium exposed to these mycotoxins without cells was considered as control. The concentrations of ZEA and its metabolites decreased in the grow medium from 77.6 ± 1.0 to 70.1 ± 0.8 for ZEA; from 66.2 ± 1.1 to 64.7 ± 1.6 for α -ZOL and from 46.8 ± 1.2 to 37.0 ± 0.9 for β -ZOL at 24 and 48h of exposure. The mycotoxins were not detected inside the cells.

Table 3 shows the degradation products obtained at 24 and 48 h for ZEA and its metabolites in the growth medium. Worth highlighting the formation of dehydroxylated products in both ZEA and its metabolites in growth medium. Table 4 shows the degradation products of ZEA and its metabolites in cells.

Discussion

In order to evaluate the combined effects between the ZEA and its metabolites (α -ZOL, β -ZOL), it is necessary to determinate the cytotoxic effect which occurs when these mycotoxins are tested alone. For that, HepG2 cells were exposed to different concentrations of these mycotoxins. The results shown that cells viability decreases

Table 3. Degradation products of ZEA, α -ZOL and β -ZOL (μ M) at 24 and 48h in the growth medium when HepG2 cells were exposed to 50 μ M of the mycotoxins.

PRODUCT	24h			48h		
	ZEA	α -ZOL	β -ZOL	ZEA	α -ZOL	β -ZOL
demethylation	0.00	0.67	0.78	1.53	0.69	1.06
dhydroxylation (-1OH)1	45.30	8.67	8.51	52.27	6.78	10.63
dhydroxylation (-1OH) 2	0.00	0.50	0.64	0.00	0.58	0.43
dhydroxylation (-2OH) 1	9.76	0.58	0.25	13.94	0.54	0.18
dhydroxylation (-2OH) 2	0.00	0.00	0.51	0.00	0.00	0.40
hydroxylation (+1OH)	0.00	7.88	0.62	0.00	12.61	0.11
glucosidation (+1G)	0.00	3.23	1.70	0.00	2.36	1.98
glucosidation (+2G)	0.00	0.67	0.18	0.45	0.00	0.11
glucuronation	0.56	0.00	0.00	2.89	0.00	0.00
16-glucose	3.41	0.00	0.00	3.48	0.00	0.00
	59.03	22.21	13.18	74.57	23.55	14.91

Table 4. Degradation products of ZEA and its metabolites (μ M) inside HepG2 cells at 24 and 48h when HepG2 cells were exposed to 50 μ M of each mycotoxin

PRODUCT	24h			48h		
	ZEA	α -ZOL	β -ZOL	ZEA	α -ZOL	β -ZOL
dhydroxylation (-1OH)	nd	nd	0.65	nd	nd	0.70
dhydroxylation (-2OH)	11.50	nd	nd	15.68	nd	nd
glucosidation (+1G)	nd	3.23	2.20	nd	2.21	2.48
	11.50	3.23	2.84	15.68	2.21	3.18

as the concentration of mycotoxins increased in the following order α -ZOL > β -ZOL > ZEA. The results obtained in this study are similar to those obtained by Marin [7] that demonstrated that in PMNs cells ZEA was less cytotoxic than its metabolites. On the other hand, Ayed [4] demonstrated that the ZEA is more cytotoxic than its metabolites, when they exposed HeLa cells to these mycotoxins for 24h. Bibliographic data obtained from different authors demonstrated that the difference in the type of mycotoxins mixtures, the method used for analyzing the concentration effect relationship, period of exposure, concentration range tested and the type of cells produce different results.

Respect to the cytotoxicity of mycotoxins mixtures, binary combinations of different mycotoxins were widely studied. However, only a few studies determine the cytotoxicity produced by tertiary combination of mycotoxins. Kouadio [13] studied the cytotoxicity that occurred when Caco-2 cells were exposed to a mixture of FB1 + DON + ZEA. In this study, the RN method was used to determine both, the cytotoxicity caused by mycotoxins individually and the cytotoxicity produced by binary and tertiary combinations. These authors obtained that the tertiary combination shows a synergism effect. Ruiz [24,25] used the isobologram method to determine whether the cytotoxicity produced by the mixture of BEA + ZEA + PAT caused additive synergism or antagonist effect when compared to the cells exposed to mycotoxins individually. These authors observed a synergism effect on CHO-K1 cells and antagonism effect on Vero cells. Klaric [26] evidenced an increase in LDH activity when compared the activity of LDH that produced the FB1, BEA and OTA alone and their mixtures which showed antagonism effect. Tatay [17] used the mixture of ZEA + α -ZOL + β -ZOL on CHO-K1 cells. Their results have shown antagonist effects at high fractions affected and synergic effect at low fractions affected.

With the isobologram method is difficult to explain this different

behaviour of mycotoxins in combination, since this method only allows quantitative determinations of synergism, additive or antagonism effect but not the mechanism whereby these interactions occurs. However, the additive effect showed by ZEA and its metabolites can be explained by the similar structure of these mycotoxins may compete with the same receptor site.

Related to biotransformation pathways of ZEA in HepG2 cells, it is possible to hypothesize that biotransformation of ZEA occurs in two major pathways: 1-Hydroxyation resulting in the two major phase I metabolites (α -ZOL and β -ZOL). 2- The conjugation of ZEA and its reduced metabolites with glucuronic acid (phase II) [27-29].

Results obtained in this study shown that HepG2 cells cannot metabolize ZEA into α -ZOL and β -ZOL but other degradation products are formed. Some of these products were found previously [17,28-31]. It was demonstrated the formation of several glucuronides and sulphates when Caco-2 cells were incubated with ZEA [28]. [28] determined the *in vivo* metabolism of ZEA through the analysis of urine samples obtained from volunteers demonstrating the urinary excretion of ZEA-14-glucuronide. Similarly, our results shown some glucuronide products when HepG2 cells were treated with α -ZOL and β -ZOL. [30] Studied the metabolism and the transfer of ZEA in Caco-2 cells as a model of intestinal epithelium. The cells were exposed to ZEA (10-100 μ M) evidencing an efficacious metabolism of the ZEA into α -ZOL and β -ZOL. [27] treated Caco-2 cells with ZEA and after an incubation of 24h analyzed the samples demonstrating that neither ZEA or its metabolites were detected in the samples. In our studied ZEA and its metabolites are detected in the medium but not inside the cells. [17] demonstrated the formation of dehydroxylated products when CHO-K1 cells were treated with α -ZOL. This study have shown the formation of dehydroxylated products when HepG2 cells are exposed to ZEA and its metabolites.

In conclusion this extraction procedure was adequate to know the concentration of these types of mycotoxins in mammalian cells. The confirmation technique (LC-MS-LIT) could help to know ZEA α -ZOL and β -ZOL and their degradation products which can contribute to cytotoxicity in HepG2 cells. And the MTT assay is a sensitive method suitable to determinate the cytotoxicity when these mycotoxins are individually and in combination. So these results obtained for ZEA α -ZOL and β -ZOL by *in vitro* toxicity assays can help to better understand the behavior of mycotoxins *in vivo*.

Acknowledgement

This work was supported by the Economy and Competitiveness Spanish Ministry (AGL2013-43194-P)

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Heussner A. H, Dietrich D. R, O'Brien E (2006) *In vitro* investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicol in Vitro* 20: 332-341.
- Ayed-Boussema I, Bouaziz C, Rjiba K, Valenti K, Laporte F, Bacha H (2008) The mycotoxin zearalenone induces apoptosis in

- human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicol in Vitro* 22: 1671-1680.
3. Metzler M, Pfeiffer E, Hildebrand A (2010) Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal* 3: 385-401.
 4. Ayed Y, Ayed-Boussema I, Ouanes Z, Bacha H (2011) *In vitro* and *in vivo* induction of chromosome aberrations by alpha- and beta-zearalenols: Comparison with zearalenone. *Mutation Research/Genetic Toxicol and Environ Mutagenesis* 726: 42-46.
 5. Luongo D, Severino L, Bergamo P, De Luna R, Lucisano A, Rossi M (2006) Interactive effects of fumonisin B1 and α -zearalenol on proliferation and cytokine expression in jurkat T cells. *Toxicol in Vitro* 20: 1403-1410.
 6. Hassen W, Ayed-Boussema I, Oscoz A. A, De Cerain Lopez A, Bacha H (2007) The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in hep G2 cells: Oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology* 232: 294-302.
 7. Marin D. E, Taranu I, Burlacu R, Tudor D. S (2010) Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. *Toxicol* 56: 956-963.
 8. Frizzell C, Ndossi D, Verhaegen S, Dahl E, Eriksen G, Sørli M, (2011) Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol Lett* 206: 210-217.
 9. Bouaziz C, Bouslimi A, Kadri R, Zaied C, Bacha H, Abid-Essefi S (2012) The *in vitro* effects of zearalenone and T-2 toxins on vero cells. *Experimental and Toxicol Pathol* 48: 343-352
 10. Alassane-Kpembé I, Kolf-Clauw M, Gauthier T, Abrami R, Abiola F. A, Oswald I.P (2013) New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol Appl Pharmacol* 272: 191-198.
 11. Boeira L. S, Bryce J. H, Stewart G. G, Flannigan B. (2000) The effect of combinations of fusarium mycotoxins (deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B1) on growth of brewing yeasts. *J Appl Microbiol* 88: 388-403.
 12. McKean C, Tang L, Tang M, Billam M, Wang Z, Theodorakis C. W (2006) Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *Food Chem Toxicol* 44: 868-876.
 13. Kouadio J. H, Dano S. D, Moukha S, Mobio T. A, Creppy E. E (2007) Effects of combinations of fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in caco-2 cells. *Toxicol* 49: 306-317.
 14. Luongo D, De Luna R, Russo R, Severino L (2008) Effects of four toxins (fumonisin B1, α -zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicol* 52: 156-162.
 15. Lu H, Fernandez-Farzón G, Font G, Ruiz M.J (2013) Toxicity evaluation of individual and mixed enniatins using *in vitro* method with CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro* 27: 672-680
 16. Prosperini A, Font G, Ruiz M.J, (2014) Interaction effects of *Fusarium enniatins* (A, A₁, B and B₁) combinations on *in vitro* cytotoxicity of Caco-2 cells. *Toxicol In Vitro* 28: 88-94.
 17. Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz M.J (2014) Interactive effect of Zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolism in ovarian CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro* 28: 95-103
 18. Gutleb A. C, Morrison E, Murk A. J (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by fusarium strains: A review. *Environ Toxicol and Pharmacol* 11: 309-320.
 19. Ruiz M.J, Festila L E, Fernandez M, (2006) Comparison of basal cytotoxicity of seven carbamates in CHO-K1 cells. *Toxicol Environ Chem.* 88: 345-354.
 20. Chou T.-Ch Talalay, P (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulations of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58: 621-681.
 21. Chou T.-Ch, Talalay, P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enz Regul* 22: 27-55.
 22. Juan C, Ritieni A, Mañes J (2012) Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem* 134: 2389-2397.
 23. Commission Decision (2002). Commission Decision 2002/657/EC, Implementing Council Directive (EC) 96/23 concerning the performance of analytical methods and the interaction of the results (text with EEA relevance). Official journal of the European Union L221.
 24. Ruiz M.J, Franzova P, Juan-García A, Font G (2011a) Toxicological interactions between the mycotoxins beauvericin, deoxynivalenol and T-2 toxin in CHO-K1 cells *in vitro*. *Toxicol* 58: 315-326.
 25. Ruiz M.J, Macáková P, Juan-García A, Font G (2011b) Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. *Food Chem Toxicol* 49: 2718-2724.
 26. Klaric M. S, Rumora L, Ljubanović D, Pepeljnjak S (2008) Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin a in porcine kidney PK15 cells: Effects of individual and combined treatment. *Arch Toxicol* 82: 247-255.
 27. Schaut A, De Saeger S, Sergent T, Schneider Y, Larondelle Y, Pussemier L (2008) Study of the gastrointestinal biotransformation of zearalenone in a caco-2 cell culture system with liquid chromatographic methods. *J Appl Toxicol* 28: 966-973.
 28. Pfeiffer E, Kommer A, Dempe J.S, Hildebrand A.A, Metzler M (2011) Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promoter zearanol in caco-2 cells *in vitro*. *Mol Nutr Food Res* 55: 560-567.
 29. Warth B, Sulyok M, Berthiller F, Schuhmacher R, Krska R (2013) New insights into the human metabolism of the fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicol Lett* 220: 88-94.
 30. Videmann B, Mazallon M, Tep J, Lecoœur S (2008) Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 46: 3279-3286.
 31. Veršilovskis A, Huybrecht B, Tangni E.K, Pussemier L, de Saeger S, Callebaut A (2011) Cross-reactivity of some commercially

available deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) immunoaffinity columns to DON- and ZEN-conjugated forms

and metabolites. Food Additives and Contaminants - Part A Chem Anal Control Exposure Risk Assessment 28: 1687-1693.

Efectos tóxicos de alternariol por ensayos *in vitro*: revisión

Juan-García A*, Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ

Laboratorio de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain

Recibido 8 de septiembre de 2014 / Aceptado 15 de octubre de 2014

Resumen: Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Las micotoxinas más abundantes son aflatoxinas (*Aspergillus*), ocratoxina A (*Penicillium*), fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol (*Fusarium*) y alternariol (*Alternaria*). De las especies de *Alternaria*, *A. alternata* es la especie productora más importante de micotoxinas. Todas están consideradas como contaminantes tóxicos que están presentes en alimentos de consumo diario. Esta revisión se centra en estudios *in vitro* relacionados con la respuesta y citotoxicidad a la micotoxina de *Alternaria*, alternariol (AOH). Para ello, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los artículos de AOH disponible en bases de datos como: Pubmed, Scopus, Science Direct y Current Contents en los últimos catorce años. Así pues, el objetivo de la revisión bibliográfica es evaluar los efectos de AOH investigados mediante ensayos *in vitro*.

Palabras clave: alternariol; *in vitro*; revisión;

Abstract: Toxic effects of alternariol by *in vitro* assays: a review. Mycotoxins are secondary metabolites produced by genera fungus of: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria*. The most frequent mycotoxins are: aflatoxins (*Aspergillus*), ochratoxin A (*Penicillium*), fumonisins, zearalenone, deoxynivalenol (*Fusarium*) and alternariol (*Alternaria*). Among all *Alternaria* spp, *A. Alternata* is the most producer mycotoxin. All mycotoxins are considered toxic contaminants present in food of daily consumption. This review is based on *in vitro* studies where response and toxicity in cells of *Alternaria* mycotoxin, alternariol (AOH) have been carried out. In this sense a bibliographic search of AOH papers available in on-line data bases such as: Pubmed, Scopus, Science Direct and Current Contents in the last fourteen years, have been collected. The main objective of this bibliographic review is to evaluate the AOH effects detected in *in vitro* assays.

Keywords: Alternariol: *in vitro*; review

Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producido por hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. La micotoxinas más abundantes (Tabla 1) son aflatoxinas (*Aspergillus*), ocratoxina A (*Penicillium*), fumonisinas, zearalenona, tricotecenos (*Fusarium*) y alternariol (*Alternaria*). En la actualidad se conocen un total de 400 micotoxinas diferentes [1]. La micotoxinas son muy difíciles de eliminar y/o de erradicar a lo largo de toda la cadena alimentaria [2]. Los climas cálidos proporcionan las condiciones adecuadas e idóneas para conseguir el crecimiento de hongos de los

géneros mencionados y la síntesis de las micotoxinas. La producción de micotoxinas puede verse favorecida por condiciones ecológicas adecuadas alcanzadas durante la recolecta, secado, manejo, embalaje, transporte y almacenamiento de los alimentos contaminados con hongos, tales como humedad, temperatura y actividad del agua del alimento [3,4].

Todas las micotoxinas están consideradas como contaminantes tóxicos que están presentes en alimentos de consumo diario. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) aproximadamente un 25% de la producción mundial de cereales está contaminada de micotoxinas; además, especias, hierbas para infusiones, fruta, frutos secos, semillas y productos derivados de estos, están contaminados también por micotoxinas [4-8].

Las micotoxinas provocan efectos tóxicos crónicos muy diversos en animales y humanos como: hepatotoxicidad, genotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, efectos sobre la reproducción, inmunotoxicidad, etc. En la Tabla 2 se recogen las micotoxinas más comunes presentes en alimentos y sus efectos tóxicos. La toxicidad puede variar dentro de un mismo grupo estructural de micotoxinas y el efecto lo puede producir tanto la misma micotoxina como los metabolitos derivados de ella [2].

Debido a la toxicidad que las micotoxinas presentan y a su presencia en alimentos, la Comisión Europea ha establecido límites máximos que se recogen en los Reglamentos 1881/2006 del 19 de Diciembre de 2006 [9] y 1126/2007 de 28 Septiembre de 2007 [10]. Existen niveles máximos para aflatoxinas, ocratoxina A, patulina y micotoxinas de *Fusarium* (zearalenona, fumonisina, deoxinivalenol, y toxinas T-2 y HT-2) [9,10] que van de 0,5 µg/kg para ocratoxina A (en cereales para alimentos infantiles) a 4000 µg/kg para fumonisinas (en maíz sin procesar). No obstante, existen micotoxinas que todavía no presentan niveles legislados, como es el caso de las micotoxinas del género *Alternaria*; de ahí, la importancia de estudiar este tipo de micotoxinas.

Las especies de *Alternaria* son los patógenos post-cosecha más comunes presentes en frutas (melones, manzanas, moras, fresas, frambuesas, uvas, pasas, naranjas, limones, mandarinas, nueces y aceitunas) capaces de producir diferentes micotoxinas. Debido a su estructura química, las micotoxinas producidas por *Alternaria* se pueden dividir en: i) dibenzo- α -pironas (alternariol (AOH), alternariol metil éter (AME) y altenuene (ALT)), ii) ácido tetrámico: ácido tenuazonico (TeA), iii) quinonas perilenas (altertoxinas I-III ATX I-III), iv) toxinas *alternata* (AAL-TA1, AAL-TA2, AAL-TB1, AAL-TB2); v) otras estructuras como los tetrapéptidos cíclicos: Tentoxina (TEN) [4]. La estructura química de algunas de estas micotoxinas se recoge en la Figura 1.

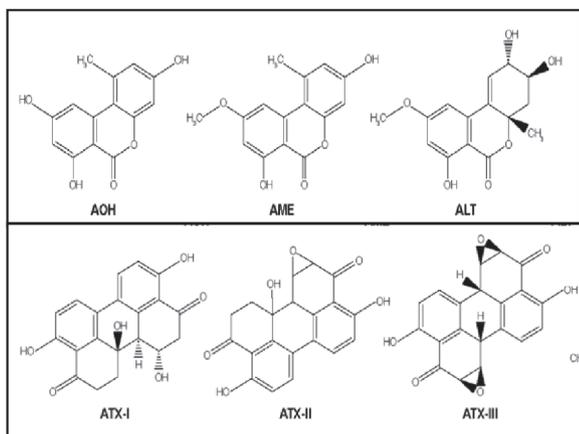
* e-mail: ana.juan@uv.es

Tabla 1. Micotoxinas principales y hongo productor (modificado de [4]).

Micotoxina	Acrónimo	Hongo
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	<i>Aspergillus flavi</i>
Alternariol	AOH	<i>Alternaria alternata</i>
Alternariol monometil eter	AME	<i>A. alternata</i> , <i>A. solani</i>
Ácido tenuazonico	TeA	<i>A. alternata</i>
Altetoxinas (I-III)	ATX (I-III)	<i>A. tenuissima</i>
Altenuene	ALT	<i>A. alternata</i>
Ocratoxina A	OTA	<i>Aspergillus circumdati</i> , <i>A. nigri</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>
Fumonisinias B1, B2	FB1, FB2	<i>Fusarium liseola</i>
Deoxinivalenol	DON	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i>
Zearalcona	ZEN	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. incarnatum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. verticillioides</i>

Tabla 2. Principales micotoxinas presentes en alimentos y sus efectos tóxicos (modificado de [2]).

Micotoxina	Efectos tóxicos	Mecanismos de acción celulares y moleculares
Aflatoxina	Hepatotoxicidad Genotoxicidad Inmunomodulación	Formación de aductos con ADN Peroxidación lipídica Bioactivación del Cit-P ₄₅₀ ; Formación de glucuronatos
Ocratoxin A	Nefrotoxicidad Genotoxicidad Inmunomodulación	Efecto en la síntesis de proteínas Inhibición en la producción de ATP Detoxificación por peptidasas
Patulina	Nefrotoxicidad Mutagénesis (<i>in vitro</i>)	Inhibición enzimática indirecta
Tricotecenos (Toxina T-2, DON)	Hepatotoxicidad Inmunomodulación Toxicidad en piel	Efecto en la síntesis proteínas Inducción de apoptosis en células progenitoras hematopoyéticas y células inmunitarias Alteraciones de las inmunoglobulinas
Zearalenona	Fertilidad y reproducción	Unión a receptores de estrógenos; Bioactivación por reductasas; Formación de glucuronatos
Fumonisinina B1	Daño en el sistema nervioso central Hepatotoxicidad Genotoxicidad Inmunomodulación	Inhibición de la síntesis de ceramida Alteración del ratio esfinganina/csfingosina Alteración del ciclo celular

**Figura 1.** Estructura de las principales micotoxinas producidas por *Alternaria*: i) dibenzo- α -pironas (alternariol (AOH), alternariol metil éter (AME) y altenuene (ALT)), ii) ácido tetramico: ácido tenuazonico (TeA), iii) quinonas perilenas (altetoxinas I-III ATX I-III)

Es frecuente encontrar los ingredientes principales para la elaboración de alimentos así como el propio alimento, contaminados con más de una especie de hongo o con más de una micotoxina. La importancia de la co-presencia de micotoxinas reside en las alteraciones de los efectos tóxicos que se pueden producir en la combinación de estas, con respecto a la toxicidad de las micotoxinas individuales; ya que se han descrito efectos de sinergismo, adición y/o antagonismo [1-13].

Con el fin de evaluar el riesgo tóxico de compuestos en humanos se deben aplicar diferentes estudios de toxicidad en animales. Sin embargo, debido al número de animales necesarios y por motivos éticos y científicos, se han establecido modelos *in vitro* que permiten trabajar con cultivos celulares y obtener datos de efectos tóxicos del compuesto ensayado.

Los datos que recoge la bibliografía de las micotoxinas de *Alternaria* reflejan la capacidad que tienen para producir efectos tóxicos tanto agudos como crónicos. Concretamente para la micotoxina AOH, se cree que tiene propiedades carcinógenas y mutágenas, aunque hasta la fecha no se han llevado a cabo ensayos *in vivo* [14], tampoco hay

datos de absorción, distribución y excreción [15]; sin embargo, tras la realización de ensayos *in vitro* se ha visto que AOH se hidroxila fácilmente con el ácido glucurónico y el sulfato dando lugar a metabolitos conjugados; que es un potente genotóxico, citotóxico, que altera la proliferación celular y las cadenas de ADN, entre otras. Dada la ausencia de legislación para AOH y la toxicidad que recogen los estudios científicos, se hace necesaria la recopilación de todos los efectos tóxicos conocidos hasta la actualidad. Para ello, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los artículos de AOH disponible en bases de datos como: Pubmed, Scopus, Science Direct y Current Contents en los últimos catorce años. El objetivo de la siguiente revisión bibliográfica es evaluar los efectos de AOH recogidos de ensayos *in vitro*.

Ensayos *in vitro* con alternariol

El número de estudios *in vitro* llevados a cabo con AOH en líneas celulares es escaso. A continuación se muestran las líneas celulares sobre las que se han desarrollado ensayos *in vitro* con AOH.

1 Células de adenocarcinoma de colon: HT-29 y Caco-2

La composición del epitelio intestinal y las interacciones de los diferentes tipos de células *in vivo* presentan características complejas. Las líneas celulares intestinales humanas Caco-2 y HT-29 aisladas de adenocarcinoma de colon humano, son las más utilizadas en ensayos *in vitro* para estudios de adhesión y de procesos de transporte epitelial [16,17]. La línea celular Caco-2 forma monocapas polarizadas en cultivos celulares y se diferencia a células muy similares a los enterocitos del epitelio intestinal [18,19]. Las células HT-29 de morfología epitelial, no están diferenciadas, son heterogéneas y contienen una proporción muy pequeña (i.e. < 5%) de células secretoras de mucosa y de enterocitos (células de las microvellosidades) y por tanto pueden obtenerse poblaciones diferenciadas bajo condiciones específicas de estrés metabólico [20].

Las células Caco-2 son las más utilizadas y las más caracterizada aunque presenta algunas limitaciones y/o ventajas según el compuesto a estudiar y por lo tanto condicionan el estudio de toxicidad que se vaya a llevar a cabo, como son: i) baja permeabilidad para compuestos hidrofílicos que atravesarían el epitelio por vía acuosa, debido a la uniformidad que presenta la monocapa lo que la hace más parecida a células de colon que a tejido intestinal; ii) están constituidas únicamente de células de absorción, mientras que el epitelio intestinal está formado por una mezcla de enterocitos y otras células como: caliciformes, endocrinas, células M,... siendo las células caliciformes el segundo tipo de célula más abundante (encargadas de producir la secreción de moco); iii) la sobre expresión de la P-glicoproteína (aunque en controversia), encargada de aumentar la secreción de moco y en consecuencia disminuir la permeabilidad para la absorción de sustancias; y iv) permeabilidad reducida para aquellos compuestos que se absorben mediados por un transportador, lo que pone de manifiesto el origen colónico de esta línea celular.

2 Células de pulmón de hámster chino: V79

La línea celular V79 fue desarrollada por Ford and Yerganian en 1958 desde tejido pulmonar de hámster chino (macho).

Las células V79 han sido ampliamente utilizadas para estudios de mutagenicidad y de reparación del ADN. Son células inmortales, tiene un ciclo celular corto y mutan fácilmente dando lugar a líneas estables aunque deficientes en enzimas de reparación del ADN, y de las funciones relacionadas con la respuesta al daño del ADN. Las células V79 no expresan la proteína *p53* y no muestran la inducción

de la respuesta producida por el gen *MDM2* al daño del ADN. Todas estas propiedades ha hecho que sean células muy útiles para desarrollar determinados ensayos celulares, pero también han hecho plantear preguntas acerca de la generalización de los resultados que con ellas se obtienen. Tanto es así, que ensayos de mutagénesis y relacionados con daño y reparación del ADN llevados a cabo con estas células se aconseja que sean interpretados con cautela debido a la interrupción/alteración de las vías normales de respuesta al daño del ADN que presentan.

3 Células de adenocarcinoma hepático: HepG2

Los hepatocitos primarios y la línea de hepatocarcinoma, HepG2, son los modelos *in vitro* ideales para llevar a cabo estudios de reacciones de biotransformación que tienen lugar en el hígado; y son excelentes para estudios toxicológicos y farmacológicos. Mantiene tanto la morfología como las funciones específicas del hígado durante largos periodos de tiempo [21,22].

Son células fáciles de mantener y reproducen el sistema humano. Aunque son poco adecuadas para predecir/estudiar el metabolismo tal y como ocurre *in vivo* o en cultivos primarios, ya que la expresión de las enzimas encargadas de la metabolización de compuestos es distinta. Sin embargo, aunque las células HepG2 no tienen enzimas específicas del hígado, un aumento de la expresión de estas aumenta la sensibilidad genotóxica de las células HepG2. La mayoría de los autores describen la expresión del citocromo P-450, perteneciente a la ruta de metabolización del hígado de fase I, pero ignoran la expresión de enzimas pertenecientes a las de fase II, las cuales son importantes para las reacciones de detoxificación y activación de muchos xenobióticos [23].

4. Otras líneas celulares

A continuación se exponen características de líneas celulares sobre las que se han llevado a cabo ensayos de toxicidad del AOH en menor proporción, como son las células: MCF-7, A431, MLC, Ishikawa, H295R, HCT116, Hepa-1 y RAW 264.7.

Las células de cáncer de mama MCF-7, se caracterizan por tener abundante factor de transcripción *p53* (wild-type: mutaciones y cadenas cortas), el cual es capaz de activar determinados genes mediante la unión a secuencias de ADN específicas. Las topoisomerasas controlan, mantienen y modifican las estructuras y la topología del ADN durante los procesos de replicación y traslación del material genético mediante la formación de un complejo de topoisomerasa-ADN. La topoisomerasa I interacciona directamente con la proteína *p53* supresora de tumores de forma inespecífica (wild-type); esta interacción dependerá del estado en que se encuentre el factor *p53*, de hecho en las células MCF-7 la asociación/interacción está estrictamente condicionada con la estructura espacial y temporal que presente el factor *p53*, y solamente ocurre durante periodos muy cortos de estrés genotóxico [24,25]. Por otra parte las células de cáncer de piel (epidermis) A431 se caracterizan por tener factor *p53* no funcional y niveles elevados de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que interfieren en el control de procesos de crecimiento, proliferación y apoptosis. Principalmente se utilizan para estudios de ciclo celular y para la señalización de rutas celulares de cáncer.

Ambos tipos de células, MCF-7 y A431 se han utilizado para estudiar la actividad de AOH sobre las topoisomerasas; bien para estudiar su efecto sobre la actividad catalítica (células MCF-7) o bien para estudiar la estabilidad del complejo topoisomerasa II-ADN (células A431).

Las células de linfoma de ratón (MLC) se utilizan para determinar el efecto mutagénico del AOH, con el estudio de la inducción de mutaciones en el locus de timidina kinasa (TK) de estas células. Las células Ishikawa se utilizan, para estudiar los efectos tóxicos sobre la reproducción, ya que estas células (de adenocarcinoma endometrial humano) contienen gran cantidad de receptores de estrógenos y de progestágenos. Las células de carcinoma adrenocortical humano H295R, se utilizan para ensayos de esteroidogénesis (disrupción endocrina), ya que contienen todas las enzimas implicadas en este proceso; además son capaces de producir hormonas esteroideas humanas y permiten evaluar alteraciones en la expresión génica y en la producción de esteroides sexuales. Las células para ensayos de genes de estrógenos RGAs inducibles de hormonas esteroideas, que se generan a partir de glándulas mamarias por inclusión de un gen de luciferasa [26]. Las células de carcinoma de colon HCT116, se han utilizado para estudios de efecto tóxico en intestino y la ruta de muerte celular, por ser la primera línea de contacto del tóxico tras una intoxicación alimentaria. Las células de cáncer hepático de ratón Hepa-1 se caracterizan por tener la ruta del AhR (receptor aril hidrocarburo) intacta (1c1c7) o deficiente (1c1c4 o 1c1c12) lo que les confiere diferente capacidad metabólica; por tanto se utilizan para estudios de metabolismo (glucuronación). Y las células de macrófagos de roedores murinos RAW 264.7, caracterizadas por tener una respuesta en el DNA funcional y la proteína p53, se han utilizado para estudios efectos en el ciclo celular a través de daños en el ADN.

Las líneas celulares en los efectos tóxicos de alternariol

Los efectos tóxicos producidos por AOH en las diferentes líneas celulares, así como el tipo ensayo, tiempo y dosis estudiada, se recogen en la tabla 3.

1. AOH en células Caco-2 y HT-29

Los ensayos llevados a cabo en células HT-29 para el estudio de los efectos producidos por AOH son muy diversos: proliferación celular, Western Blot, estrés oxidativo, glutatión, Cometa (lesión del ADN),...; y de igual modo la dosis, que va desde 0,1 a 100 μM ; y el tiempo de exposición: de 20 min a 24 h. Los efectos del AOH para este tipo de células se recogen a continuación. Tiessen y col, 2013 [27] recoge que: i) a concentraciones elevadas de AOH se reduce la proliferación celular, aumenta la actividad enzimática de GST y se incrementa el estrés oxidativo; coincidiendo con la sobreexpresión de tres genes relacionados con la respuesta antioxidante; mientras que ii) a las concentraciones y tiempos de exposición más bajos, los niveles de GSH disminuyeron llegando incluso a no ser detectables (Tabla 3).

En cuanto a la lesión del ADN, realizado con el ensayo Cometa, este sólo fue observable a concentraciones $\geq 1 \mu\text{M}$ y tiempo de exposición de 1h; resultados que coinciden con los publicados previamente en 2012 [28] con el mismo tipo de ensayo. Este daño se ha visto que está relacionado con la viabilidad celular, la cual se vio afectada principalmente a tiempos de exposición prolongados ($\geq 24\text{h}$); no obstante, a tiempos bajos de exposición (1h) ésta se mantiene con valores $>85\%$ y sin alteración de los niveles de la lactato deshidrogenasa (LDH) [29].

Recientemente Fernández-Blanco y col. [30] han estudiado los efectos que AOH produce en la proliferación celular, estrés oxidativo (especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipoperoxidación lipídica (LPO)) y actividad enzimática (catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD)). Los resultados permiten concluir que a tiempos prolongados de exposición ($\geq 48 \text{ h}$) se produce una disminución del

número de células a medida que aumenta la concentración; mientras que a tiempos cortos de exposición (24 h) se produjo un aumento de ROS, LPO y de la actividad enzimática de SOD. La actividad de la CAT disminuyó a concentraciones $> 15 \mu\text{M}$.

Por otra parte, la generación de metabolitos tras la exposición a AOH se llevo a cabo tanto en células HT-29 [31] como en células Caco-2 [32]. Ambos estudios coinciden en que los metabolitos conjugados con ácido glucurónico (glucuronidación) son los más abundantes y los que se producen instantáneamente; incluso para la concentración y tiempo de exposición más bajo estudiado (20 μM durante 1 h). Las posiciones de conjugación por glucuronación del AOH se produjeron en los grupos hidroxilo del carbono 3 y 9, mientras que con sulfato se produjo el carbono 3. Por otra parte, se realizó un estudio de "liberación de AOH" desde el glucuronato generado mediante la adición simultánea de sulfato aril-beta-glucuronidasa, en células HT-29 observándose que la liberación de éste se producía en forma concentración dependiente [31] (Tabla 3). Así, la capacidad que posee AOH de producir daño celular se ve disminuida por la elevada capacidad que tanto las células HT-29 como las Caco-2 presentan para eliminar la micotoxina y los metabolitos generados a través de reacciones de glucuronidación.

Se estudió también el paso a través de la membranas apical o basal del AOH, simulada con la placas de Millicell®, y se observó que las formas conjugadas eran capaces de atravesar ambas membranas, mientras que la forma libre se acumula en el compartimento basolateral; concluyendo que la absorción a nivel intestinal de AOH era rápida y amplia [32].

2. AOH en células V79

En las células V79 principalmente se han llevado a cabo cuatro ensayos para el estudio de los efectos tóxicos producidos por AOH: daño al ADN, alteración del ciclo celular, genotoxicidad y mutagenicidad.

Los daños en las cadenas de ADN en las células V79 tras exposición a AOH durante tiempos cortos (1h) se produjo en forma concentración dependiente [31,33]. Teniendo en cuenta que estas células no presentan enzimas y por tanto no producen reacciones de metabolización (hidroxilación y de glucuronidación), no se generan metabolitos [31] y en consecuencia la alteración de la viabilidad celular se debe únicamente al AOH en concentraciones elevadas ($\geq 30 \mu\text{M}$) [34] (Tabla 3).

Tras el estudio de la distribución del ciclo celular, se observó una alteración de las fases del ciclo tras la exposición a AOH, mostrándose una acumulación de células en la fase G2/M de forma concentración dependiente (32% a 10 μM y 62.6% a 30 μM) [33-35]. Esta acumulación también se observó en la fase S a medida que aumenta el tiempo de exposición; hecho que se asoció a la acumulación de células en la fase G2/M a tiempos inferiores [35].

La inducción de micronucleos (MN) se utilizó para estudios de genotoxicidad. Los resultados demostraron la capacidad genotóxica de AOH mediante el aumento los MN en tiempo y concentración dependiente [35] (Tabla 3).

Brugger y col. [34] y Fleck y col. [33] estudiaron la capacidad de producir mutaciones en el gen del locus de la hypoxantina-guanina fosforiltransferasa (HPRT) tras varios periodos de exposición (1, 3 y 6 días). Los resultados demostraron que se producían mutaciones en los genes de este locus, concluyéndose que el AOH tiene actividad mutagénica [33,34].

Tabla 3. Línea celular, dosis, tiempo de exposición, ensayo y efecto obtenido en ensayos in vitro llevados a cabo con la micotoxina Alternariol (AOH).

Línea celular	Dosis Tiempo de exposición	Ensayo	Efecto	Ref.
HT-29	0,1-50 µM a) 24 h b) 3 h c) 1 h d) 20 min, 1 y 3 h e) 1 y 24 h f) 1 y 3 h	A) SRB (a) B) Proliferación celular (WST-1) (b) C) DCF (c) D) Western Blot (contenido de Nrf2) (d) E) RT- PCR (Nrf2/ARE para tres genes) (b) F) GSH/GSSG (e) G) Actividad de GST (e) H) Cometa (f) A) Cometa (c) B) DCF (c)	A) A 50 µM de AOII se produjo una reducción de las proteínas celulares (10-15%). B) La actividad mitocondrial no se vio afectada. C) AOH produjo estrés oxidativo (5,5 veces más que el control) D) A los 20 min: no hubo efecto A 1 y 3 h: AOII aumento los niveles de la proteína nuclear Nrf2 E) AOH produjo aumento de tres genes (GSTA1, GSTA2 y γGCL) de forma concentración-dependiente F) A 1 h: los niveles de GSH total disminuyeron a 10 y 50 µM G) A 1 h: AOH no afectó la actividad de la GST A 24 h: AOH aumentó la actividad de GST (los niveles más altos a 50 µM) I) AOII no causa daño en el ADN	[27]
		A) AOH posee acción moderada sobre la rotura de las cadenas de ADN. B) AOH aumentó 2,5 veces la señal de DCF a 50 µM	[28]	
Caco-2	a) 20 µmol/L 1, 2 y 3 h b) 10, 20, 30, 40 µmol/L 2 h a) 3, 125-100 µM 24, 48 y 72 h b) 15, 30 y 60 µM 24 h c) 15, 30 y 60 µM 120 min	A) Detección de metabolitos (a) B) Absorción con placas de 24-pocillos Millicell® plates (medidas a intervalos de 30 min) (b) A) Citotoxicidad (a): -MTT, -RN, -CP B) IPO (b) C) Especies reactivas de oxígeno intracelulares (H ₂ -DCFDA); (e) D) Actividad de la SOD; (b) E) Actividad de la CAT; (b)	A) Glucuronidación de AOII en el grupo hidroxilo del C-3 y C-9; conjugación con sulfato en el grupo hidroxilo del C-3 B) Las formas conjugadas de AOH atravesaron las membranas apical y basal; el AOH libre alcanzó el compartimento basolateral. A) AOH redujo el número de células a las 48 y 72 h para los ensayos de MTT, RN y CP, alcanzando máximos de 40, 30 y 45% respectivamente. B) AOH aumentó el MDA en forma concentración-dependiente, siendo el máximo a 60 µM (250%) C) AOII produjo aumento de las ROS a todas las concentraciones ensayadas; el cual fue más notable a tiempos más bajos que a altos (de 1,4 veces) D) AOH aumentó la actividad de la SOD con la concentración (93% para 60 µM) E) AOII disminuyó la actividad de la CAT a concentraciones >15 µM (53% a 30 µM).	[32]
		A) Viabilidad y citotoxicidad (a): -Azul de Tripán y -LDII B) Cometa (b) C) Ensayo alcalino con Hoechst 33258 (1 µM) como ligando de unión (c)	A) La viabilidad celular (>85%) se mantuvo a lo largo de todo el ensayo. AOH no afectó la liberación de LDII. B) AOH (≥1 µM) produjo un aumento de la rotura de las cadenas de ADN tras 1 h de tratamiento C) AOH muestra un valor de EC ₅₀ de 8,1±1,2 µM	[29]
A431	0-100 µM 1 h	Ensayo de depleción de inmunobanda	AOII afecta a las topoisomerasas celulares, especialmente a la isoforma Top.IIα	[29]
V79	0-20 µM a) 24 h b) 1,5 h	A) Ensayo de HPRT (1, 3 y 6 días) (a) B) Ciclo celular (CyStain DNA Protein 2, Partec) (a) C) Ensayo alcalino con Hoechst 33258 (b)	A) AOII produce un aumento dependiente de la concentración en la frecuencia de mutaciones B) AOH afecta al ciclo celular y produce acumulación de células en la fase G2/M (32%, 10 µM). C) AOH produjo rotura de las cadenas de ADN	[33]
V79 HT-29 HepG2	a) 1-50 µM 1 y 24 h b) 1-25 µM 24 h	A) Ensayo alcalino con Hoechst 33258 (a) B) Conjugación de AOH (a) (detección de metabolitos) C) Actividad de glucuronidación específicamente con 2 mM de UDPGA (b)	A) A 1 h: aumentó la rotura de las cadenas de ADN de forma concentración-dependiente (de 5 a 50 µM). A 24 h: sólo en las células HepG2 aumentó la rotura de las cadenas de ADN. B) Las células HT-29: -produjeron reacción de conjugación (glucuronidación), mientras que un 75% de las HepG2 no lo hicieron (a 1 y 24 h) -fueron mucho más activas en la conversión de AOH conjugado que las HepG2 -aumentaron el AOH libre cuando se trataron con β-glucuronidasa/aryl sulfato en forma concentración-dependiente. C) Las células HT-29 tienen mucha mayor actividad de reacción de glucuronidación que las otras líneas celulares estudiadas.	[31]
V79 MLC	0-30 µM 24 h	A) Citotoxicidad B) Ensayo de HPRT (1, 3 y 6 días en células V79) Ensayo TK (1, 2 y 3 días, en células MLC) C) Ciclo celular (CyStain DNA Protein 2, Partec)	A) Disminución de la viabilidad celular en forma concentración-dependiente a concentraciones ≥30 µM (V79, 35%) o 20 µM (MLC, 69%). B) AOH produjo mutaciones en el locus HPRT (células V79) y en el locus TK (células MLC). C) Aumento de las células en la fase G2/M en forma concentración-dependiente, tanto en las células V79 (62,6%; 30 µM) como en las MLC (37,1%; 20 µM).	[34]
Ishikawa V79	Células Ishikawa: 0-10 µM a) 48 y 72 h b) 48 h Células V79: 0-50 µM c) 6 h d) 6, 14 y 24 h	Ensayo de estrogenicidad: A) ALP (con y sin: E2 o ICI182.780). Medida cada 10 min durante 1 h. (sólo en células Ishikawa); (a) B) RT- PCR (para mRNA de la expresión de ALP) (sólo en células Ishikawa); (a) C) Proliferación y distribución del ciclo celular (CyStain DNA Protein 2, Partec); (a y c) Ensayos de genotoxicidad D) Inducción de MN: MN neg. y MN pos. (DAPI: 1 µg/mL). (b y d)	A) AOH induce ALP con una EC ₅₀ =2,7±1,7 µM; 10.000-veces más débil que E2; esta inducción se inhibió tras el tratamiento simultáneo con ICI182.780. No se observó una reducción de ALP tras el tratamiento simultáneo con 10 nM de E2. B) Misma expresión de mRNA de ALP para el tratamiento con AOH o con E2; mientras que esta se inhibió con el tratamiento simultáneo de AOII con ICI182.780. C) La proliferación de las células Ishikawa disminuyó de 48 a 72 h (50%) tras el tratamiento con AOH. Estos efectos se correlacionaron con los efectos observados en el ciclo celular. Para las células V79 no se observaron modificaciones en la proliferación celular ni a las concentraciones más elevadas (25 y 50 µM). En cuanto al ciclo celular, el tratamiento con AOH produjo una disminución de células en la fase G1/G0 de forma concentración-dependiente y un aumento en la fase S y G2/M debido a la acumulación de células en G2 en los dos tipos de células. D) En las células Ishikawa, AOII aumentó la suma total de MN neg. + MN pos. a las concentraciones más altas estudiadas; mientras que en las células V79, este aumento se obtuvo de forma tiempo y concentración-dependiente. AOH disminuyó la actividad de ALP debido a una disminución de la proliferación celular.	[35]

MCF-7	0-200 μ M 1 h	D) Topoisomerasa I - Ensayo de relajación - Ensayo de ruptura F) Topoisomerasa II - Ensayo de decatenation - Ensayo de ruptura	D) AOH inhibe la actividad catalítica de la Top.I a 50 μ M. AOH mejora la proporción de ADN plásmido circular en forma dependiente de la concentración. F) AOH inhibe la actividad catalítica de -Top.II α a conc. \geq 25 μ M -Top.II β a conc. \geq 100 μ M AOH estabiliza: Top.II α -ADN intermediario a conc. \geq 10 μ M Top.II β -ADN intermediario a conc. \geq 50 μ M AOH tiene menor efecto sobre Top.II β	[29]
H295R RGAs*	a) 0,1-1000 ng/mL b) 50-10000 ng/mL c) 25-5000 ng/mL 24 y 48 h d) 3,87 μ M a 48 h	A) Citotoxicidad: - Alamar Blue (células H295R) (a) - MTT (células RGAs) (b) B) Esteroidogénesis - Test agonista (b) - Ensayo genético – Test antagonista (c) C) Producción de hormonas (a) : progesterona, estradiol, testosterona y cortisol D) RT-qPCR - expresión genética (d)	A) La viabilidad de las células H295R no varió a las concentraciones estudiadas; mientras que para las células RGAs se produjo a las concentraciones más altas estudiadas. B) AOH produjo un efecto agonista a las concentraciones más altas, probablemente relacionado con el efecto citotóxico. AOH produjo un efecto de sinergismo en la unión de la progesterona al receptor progestágeno. C) AOH aumentó la producción de progesterona y estradiol. D) AOH fue capaz de regular la expresión de los genes analizados.	[35]

ARE: elementos de respuesta antioxidante; Nrf-2: factor-2 nuclear; SRB: ensayo de sulforodamina B; HPRT: hipoxantina-guanina fosforiltransferasa; RT-PCR: PCR tiempo real; MLC: células de linfoma de ratón L5178Y tk⁺/-; TK: timidina quinasa; ALP: ensayo de las fosfatasa alcalinas; E2: 17 β -estradiol marcado radiactivamente (inductor de ALP); ICI182.780: receptor antagonista estrogénico de elevada afinidad; MN: micronúcleos; MN neg.: micronúcleos negativos; fragmentos de cromosomas acéntricos; MN pos.: micronúcleos positivos; cromosomas enteros; I1295R: carcinoma adenocarcinoma humano; *RGAs: líneas celulares para ensayos de genes de estrógenos; MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difenil tetrazolium; RN: rojo neutro; CP: contenido de proteínas; LPO: lipoperoxidación lipídica; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; MDA: malondialdehído.

3. AOH en células HepG2

Actualmente, un único artículo recoge la capacidad del AOH para producir alteraciones/daño en las cadenas de ADN de las células HepG2 [31]. Estos autores observaron que las células HepG2 tienen una mayor sensibilidad a la alteración de las cadenas de DNA que la que producen otras líneas celulares como HT-29 o V79. Además ofrecen mayor resistencia a producir reacción de conjugación incluso a tiempos de exposición prolongados (24h); probablemente debido a la inespecificidad enzimática que esta células poseen (Tabla 3).

4. Efectos de AOH en otras líneas celulares

Con el fin de estudiar si los efectos de AOH sobre las cadenas de ADN están relacionados con interferencias en la actividad catalítica de las topoisomerasas I y II (Top. I y Top. II con sus isoformas: Top.II α y Top.II β), se llevo a cabo un estudio sobre las células MCF-7 [29]. Los resultados demostraron que AOH inhibe la actividad catalítica de ambas topoisomerasas, aunque este efecto era más acusado para la Top. I (conc. \geq 50 μ M) que para las Top.II (α y β) y para la Top. II α más que para la Top. II β . Estos resultados se corroboraron mediante un ensayo de depleción de inmunobanda con Western Blot de las topoisomerasas en células A431 [29].

El efecto mutagénico y sobre la reproducción del AOH se ha llevado a cabo con células MCL y Ishikawa. El AOH demostró que en células MCL tiene actividad mutagénica sobre el locus TK a dosis \geq 10 μ M y tiempos de exposición \geq 24h: estos efectos se relacionaron con la alteración en la distribución del ciclo celular, ya que se produjo un aumento de células en la fase G₂/M del ciclo con el aumento de la concentración (37% para 20 μ M) (Brugger y col., 2006). Sobre la reproducción, se observó una disminución de la proliferación de las células Ishikawa desde las 48 a las 72h de exposición, que estuvo correlacionado con las alteraciones observadas en la distribución del ciclo celular; la proporción de células en la fase G₁/G₀ que disminuyó con el aumento de la concentración, mientras que la proporción de células en la fase S y G₂/M aumentaron [35].

Los efectos de citotoxicidad por AOH en las células RGAs sólo se produjeron a las concentraciones más altas (\geq 2500 ng/mL), mientras que este efecto no se observó para las H295R. En los ensayos de esteroidogénesis, para las mismas condiciones y para los dos tipos de

células, AOH produjo un efecto agonista y de sinergismo con la progesterona, aumentó la producción de hormonas (progesterona y estradiol) y aumento la expresión génica de aquellos genes implicados en la esteroidogénesis [36].

Los estudios sobre la ruta de muerte celular de AOH con células HCT116 muestran que esta se produce por apoptosis dependiente de la actividad de la caspasa-9, en forma dosis dependiente, a través de la apertura de los PTP, y produciendo indirectamente la activación y despolarización del MMP [37]. La producción de ROS por AOH se asoció a las alteraciones mitocondriales provocadas por AOH, mientras que la sobreexpresión de p53 y aumento de la actividad de la caspasa-3 se debió a la apoptosis producida por AOH. Por otra parte, el ensayo de AOH con células HCT116-Bax-KO, deficientes en la proteína pro-apoptótica Bax, refleja la capacidad protectora de esta proteína en las alteraciones mitocondriales producidas por AOH [37].

Estudios de metabolización con diferentes tipos de células Hepa-1 (Hepa-1c1c4, Hepa-1c1c7, Hepa-1c1c12) tras la exposición a AOH demuestran que la actividad enzimática de Cit-P450 disminuye [38]. Por otra parte, el metabolito mayoritario (no oxidativo) detectado fue el 4-hidroxilado de AOH aunque sólo en las células Hepa-1c1c12. La actividad enzimática más baja de la catecol-O-metiltransferasa se obtuvo en las células Hepa-1c1c7, mientras que la más alta, para la UDP-glucuronosiltransferasa, en las células Hepa-1c1c4. En general se observó que las formas conjugadas de AOH aumentan con el aumento del tiempo de exposición. Y por último, el ciclo celular de estas líneas celulares tratadas con AOH se detuvo en la fase G₂/M, aunque sólo para las células Hepa-1c1c7 y Hepa-1c1c12 [38].

Los efectos tóxicos del AOH sobre el ciclo celular a través de daños en el ADN se han estudiado en las células RAW 264.7. Los resultados revelan que a dosis bajas (15 y 30 μ M) se reducía la proliferación celular, mientras que a dosis altas (60 μ M) se producía muerte celular por necrosis con aumento de las células en la fase G₂/M para todas las dosis y tiempos ensayados, efectos que coincidieron con la de otros autores. Se observó también un aumento de ROS, lo que produjo en consecuencia despolarización del MMP así como un aumento en las proteínas involucradas en la reparación y generación del ADN (histona H2AX fosforilada, Chk-1 y Chk-2) [39]. En un estudio posterior llevado a cabo por el mismo grupo de autores, se

estudiaron alteraciones implicadas en el efecto de AOH en el ciclo celular y que se van produciendo en los diferentes estadios de afectación del ciclo celular [40]. Así se ensayaron los efectos en la fluidez de membrana, se determinaron proteínas intracelulares (Histona H3 como marcador mitótico y el complejo ciclina B-cdc2) y gangliósidos implicados en la organización de las bases lipídicas (GM1). Los resultados demostraron que tras la exposición a AOH las células mitóticas disminuyeron, los niveles de proteínas implicadas en el complejo ciclina B-cdc2 aumentaron, al igual que la fluidez de la membrana [40].

Conclusiones

Los ensayos *in vitro* recogidos en la bibliografía con la micotoxina AOH ponen de manifiesto la capacidad que tiene de producir reducción en la proliferación y viabilidad celular, aumento de la actividad enzimática de GST y SOD, disminución de la actividad de la CAT, acumulación de ROS, inducción de LPO, generación de metabolitos conjugados con ácido glucurónico, detención del ciclo celular en la fase S, lo que produce una acumulación en la fase G2/M, inhibición catalítica de las topoisomerasas, daños en el ADN, aumento de la esteroidogenesis y capacidad genotóxica y mutagénica.

En resumen, los resultados obtenidos revelan la capacidad de AOH de provocar efectos tóxicos a corto y largo plazo, y por tanto la especial atención que hay que poner a esta micotoxina, así como la necesidad de legislar sus niveles en alimentos. Por otra parte, dada la presencia simultánea de sustancias tóxicas en un alimento, el planteamiento de futuros ensayos *in vitro* relacionados con la acción del AOH debería de ir encaminado al estudio de la alteración de estos efectos tóxicos mediante combinaciones dobles, triples o cuádruples de micotoxinas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2013-43194-P)

Bibliografía

- Juan-García A, Manyes L, Ruiz MJ, Font G (2013) Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review. *Food Chem Toxicol* 56:40-59.
- Debongnie P (2009). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01.
- Ashiq S, Hussain M, Ahmad B (2014) Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. *Fungal Genet Biol* 66:1-10.
- Marin S, Ramos A, Cano-Sancho G, Sanchis V (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol* 60:218-237.
- Juan C, Mañes J, Raiola A, Ritieni A (2013) Evaluation of beauvericin and enniatins in Italian cereal products and multicereal food by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chem* 140:755-762.
- Juan C, Ritieni A, Mañes J (2012) Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem* 134:2389-2397.
- Fernandez-Pinto V (2008) Detection and determination of *Alternaria* mycotoxins in fruits and vegetables. In: *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Barkai-Golan R. and Nachman P. (eds.), Academic Press, San Diego, CA, USA, 271-278.
- Rasmussen R, Storm I, Rasmussen P, Smedsgaard J, Nielsen K (2010) Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 397:765-776.
- Reglamento de la Comisión Europea (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal L* 364.
- Reglamento de la Comisión Europea (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Official Journal L* 255/14.
- Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald I (2012) Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed - Focus on Europe. *Toxins* 4:788-809.
- Ruiz M, Macáková P, Juan-García A and Font G (2011) Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. *Food Chem Toxicol* 49:2718-2724.
- Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz MJ (2014) Interactive effects of zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolism in ovarian CHO-K1 cells. *Toxicol Vitro* 28:95-103.
- Magan N, Olsen M. (2004) *Mycotoxins in food*. 1st ed. Boca Raton, FL (USA): CRC Press.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011) Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 9 10:2407.
- Cencic A, Langerholc T (2010) Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology - A review. *Int J Food Microbiol* 141:S4-S14. extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J* 3:174-177.
- Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D (2011) Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In: Teriung, R.L., Williams, J.A. (Eds.), *Comprehensive Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology, Intestinal Absorption and Secretion*. American Physiological Society, Bethesda, USA 223-255.
- Pinto M, Robine-Léon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, et al., (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47:323-330.
- Rousset M, (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68:1035-1040.
- Huet G, Kim I, de Bolos C, Lo-Guidice JM, Moreau O, Hermon B, Richet C, Delannoy P, Real FX (1995) Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. *J Cell Sci* 108:1275-1285.

21. Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, and Tompkins RG (1989) Hepatocyte function and extracellular-matrix geometry- long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB Journal* 3:174-177.
22. Bader A, Rinkes IH, Closs EI, Ryan CM, Toner M, Cunningham JM, Tompkins RG, and Yarmush ML (1992) A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic processes: cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnol Prog* 8:219-225.
23. Cantelli-Forti G, Hrelia P, and Paolini M (1998) The pitfall of detoxifying enzymes. *Mutat Res* 402:179-183.
24. Gobert C, Skladanowski A, Larsen AK (1999) The interaction between *p53* and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant *p53* *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 96:10355-10360.
25. Bielawski A, Winnicka K, Bielawska A (2006) Inhibition of DNA Topoisomerases I and II, and Growth Inhibition of Breast Cancer MCF-7 Cells by Ouabain, Digoxin and Proscillaridin. *A Biol Pharm Bull* 29:1493-1497.
26. Hecker M, Newsted JL, Murphy MB, Higley EB, Jones PD, Wu R, Giesy JP (2006) Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid *in vitro* determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. *Toxicol Appl Pharmacol* 217:114-124.
27. Tiessen C, Fehr M, Schwarz C, Baechler S, Domnanich K, Böttler U, Pahlke G, Marko D, (2013) Modulation of the cellular redox status by the *Alternaria* toxins alternariol and alternariol monomethyl ether. *Toxicol Lett* 216:23-30.
28. Schwarz C, Kreutzer M, Marko D (2012a) Minor contribution of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid to the genotoxic properties of extracts from *Alternaria alternata* infested rice. *Toxicol Lett* 214:46-52.
29. Fehr M, Pahlke G, Fritz J, Christensen MO, Boege F, Altemöller M, Podlech J, Marko D, (2009) Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the IIalpha isoform. *Mol Nutr Food Res* 53, 441-451.
30. Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ (2014) Oxidative stress of alternariol in Caco-2 cells. *Toxicol Lett* 229:458-464.
31. Pfeiffer E, Eschbach S, Metzler M (2007) *Alternaria* Toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*. *Mycotoxin Research* 23:152-157.
32. Burkhardt B, Pfeiffer E, Metzler M (2009) Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells *in vitro*. *Mycotox Res* 25:149-157.
33. Fleck SC, Burkhardt B, Pfeiffer E, Metzler M (2012) *Alternaria* toxins: Altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett* 214, 27-32.
34. Brugger EM, Wagner J, Schumacher DM, Koch K, Podlech J, Metzler M, Lehmann L (2006) Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett* 164:221-230.
35. Lehmann L, Wagner J, Metzler M (2006) Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem Toxicol* 44:398-408.
36. Frizzell C, Ndossi D, Kalayou S, Eriksen GS, Verhaegen S, Sorlie M, Elliott CT, Ropstad E, Connolly L (2013) An *in vitro* investigation of endocrine disrupting effects of the mycotoxin alternariol. *Toxicol Appl Pharmacol* 271:64-71.
37. Bensassi F, Gallerne C, Sharaf El Dein O, Hajlaoui MR, Bacha H, Lemaire C (2012) Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin Alternariol. *Toxicol In Vitro* 26:915-23.
38. Burkhardt B, Jung SA, Pfeiffer E, Weiss C, Metzler M (2012) Mouse hepatoma cell lines differing in aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling have different activities for glucuronidation. *Arch Toxicol* 86: 643-9.
39. Solhaug A, Vines LL, Ivanova L, Spilsberg B, Holme JA, Pestka J, Collins A, Eriksen GS (2012) Mechanism involved in alternariol-induced cell cycle arrest. *Mutat Res-Rev Mutat Res* 1-11.
40. Solhaug A, Holme JA, Haglund K, Dendele B, Sergent O, Pestka J, Lagadic-Gossmann D, Eriksen GS (2013) Alternariol induces abnormal nuclear morphology and cell cycle arrest in murine RAW 264.7 macrophages. *Toxicol Lett* 219: 8-17.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Los manuscritos, **en español o inglés**, se someterán por el editor a dos expertos que actuarán como revisores externos a la revista, cuyas observaciones se trasladarán al autor para la reescritura del original en caso de ser aceptados.

El texto debe ser claro y conciso, cuidando la ortografía y la utilización de abreviaturas (SI). Tanto la forma como el contenido deberán ser cuidadosamente revisados antes de su envío. Se utilizará **interlineado a doble espacio, letra tipo Times New Roman de 12 puntos, sin sangrías en los párrafos, con justificación completa**, con márgenes amplios, en tamaño DIN A4, preferiblemente en archivo Word. Todas las páginas irán numeradas correlativamente. El manuscrito se divide en los siguientes apartados:

Título descriptivo del artículo (no en mayúsculas) y **Title**, además de una versión corta del título.

Apellido/s e inicial/es del nombre del autor/es.

Institución/es donde se ha realizado el trabajo, distinguiéndolas con numerales en superíndice. Marcar con un asterisco el autor de contacto e incluir su correo electrónico, teléfono y fax.

Resumen y Abstract. Las versiones en español e inglés serán lo más informativas posible, en un solo párrafo, con una pequeña introducción, la identificación de los métodos, los resultados abreviados y particularmente las conclusiones del trabajo. Su lectura dará una idea clara del mismo. Ninguno debe sobrepasar las **250** palabras ni incluir abreviaturas, referencias o tablas.

Palabras Clave y Key Words tras cada resumen, con hasta cinco palabras separadas por comas. En artículos en inglés el orden es el inverso.

Introducción: descripción de los orígenes y bases del estudio.

Material y Métodos. Se evitarán descripciones de todo aquello que pueda encontrarse en la bibliografía citada. Deben describirse de forma concisa los individuos y series estudiados, criterios de selección, procedimientos, duración y número de repeticiones de los ensayos, equipo y materiales utilizados y cuantos datos puedan precisarse para la repetición del estudio. Deben especificarse las técnicas analíticas y los métodos estadísticos. Para sustancias químicas o fármacos se citará el nombre genérico conforme a la IUPAC. Si se utiliza una marca registrada, se hará constar el nombre genérico y el nombre del fabricante.

Resultados. Se presentarán las observaciones realizadas, sin interpretarlas, así como el análisis estadístico. Los datos numéricos se pueden presentar en tablas o figuras, pero sin repetirlos entonces en el texto.

Discusión: en ella se considerarán los resultados presentados comparándolos con otros publicados, las razones que apoyan la validez de los mismos, su aplicación práctica y las directrices para nuevas investigaciones.

Conclusiones. Breves obtenidas directamente del trabajo

Agradecimientos. Si fueran necesarios, particularmente a las entidades financiadoras.

Bibliografía. La exactitud de las referencias bibliográficas es responsabilidad de los autores. Sólo deberían incluirse referencias relacionadas estrechamente con el trabajo. *Se promoverá la citación de artículos previos publicados en la Revista de Toxicología.* Todas las referencias listadas deben ir citadas en el texto. Deberían evitarse citas como "observaciones no publicadas".

Las referencias irán numeradas por orden de aparición en el texto y

citadas numéricamente entre corchetes. Por ejemplo: [1], [2,9-13]. Al final del texto la bibliografía irá citada de la siguiente manera:

a) artículos de revistas: apellidos e iniciales de todos los autores, año, título completo, revista en su abreviatura normalizada, número de volumen y primera y última página y utilizando los signos de puntuación como en el ejemplo.

7. de la Peña E, Herrera A, Barrueco C, Canga C (1988) Sistemas de activación metabólica. Rev Toxicol 6: 33-38.

b) libros: apellidos e iniciales de los autores, año de publicación, título completo del libro, editorial, lugar de publicación y nº de páginas o, si se trata de un capítulo, apellidos e iniciales de los autores, año de publicación, título del capítulo, en: editores del libro, título completo del libro, editorial, lugar de publicación y primera y última página:

21. de la Peña E, Burguete I, Guadaño A (1999) Evaluación Mutagénica y Genotóxica. Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, MURCIA98. Madrid. pp. 398.

14. de la Peña E, Guadaño A, Repetto G (1999) Métodos alternativos y complementarios en experimentación animal. En: Pérez-García CC, Díez-Prieto L, García Partida P (cols) Introducción a la Experimentación y Protección Animal. León. Universidad de León. 215-223.

Tablas

· Deben ser tan claras y simples como sea posible
· Las tablas se incluyen tras la bibliografía, en páginas independientes, numeradas correlativamente (1,2...).

· Los títulos deben ser suficientemente descriptivos para hacerlos comprensibles sin necesidad de consultar el texto.

· La información adicional puede incluirse como nota al pie de tabla o figura.

· Las tablas debieran ser lo suficientemente cortas para evitar dividir las.

Figuras

· Los pies de las figuras deben incluirse en el documento principal del manuscrito, tras las tablas, numeradas consecutivamente (1,2...). Deben ser suficientemente descriptivos para hacerlos comprensibles sin consultar el texto

· Pero las figuras propiamente dichas se envían en archivos individuales. Las imágenes se enviarán digitalizadas, preferiblemente en formato TIFF o JPEG, de al menos 300 ppp. de resolución (pero no mucho más) para el tamaño final. La versión impresa de la revista no admite colores, por lo que las figuras debieran ser comprensibles en escala de grises. Los símbolos identificadores preferidos en las figuras son círculo, cuadrado y triángulo abiertos o llenos.

· Las figuras deben tener suficiente calidad. No contendrán los títulos ni referencia a su número ni tendrán innecesariamente espacio en blanco alrededor.

· Las señales y leyendas se pueden incluir dentro de los ejes de la figura.

· Las figuras publicadas previamente deben contar con el permiso escrito del titular de los derechos

La redacción de la revista se reserva el derecho de introducir modificaciones en los artículos recibidos, siempre que no alteren el sentido de los mismos, para adaptarlos al estilo de la revista.

Los trabajos se envían a través de la web:

<http://ojs.diffundit.com/index.php/revtoxicol>

accediendo por Identificación/Login o a través de Registro si no se ha utilizado antes

En el sistema se incluyen por separado el texto y las figuras.

Editor:

Guillermo Repetto Kuhn. Universidad Pablo de Olavide.

Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

Ctra. de Utrera Km 1, 41013 - Sevilla, España

E-mail: revista@aetox.es

Editoras adjuntas:

M^a del Prado Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura. Cáceres.

María José González Muñoz. Universidad de Alcalá. Madrid.



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Rev. Toxicol. 31 (2) 103-204 2014

ISSN 0212-7113

e-revist@s

<http://www.aetox.es>

Asociación Española de Toxicología

Presidenta: Dra. Ana Cameán Fernández
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

Vicepresidenta: Dra. M^a José Ruiz Leal
Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.

Secretaria: Dra. Emma Martínez López.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Tesorera: Dra. Ángeles Jos Gallego.
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

Internet: <http://aetox.es>

Sección de Toxicología Clínica

Dr. Tomás Camacho García
(atcamacho@lemabandin.com)
Laboratorios Lema & Bandín. Vigo.

Sección de Toxicología Ambiental

Dra. M^a José González Muñoz
(mariajose.gonzalez@uah.es)
Universidad de Alcalá. Madrid.

Sección de Métodos Alternativos

Dr. Guillermo Repetto Kuhn
(grepkuh@upo.es)
Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.

Sección de Seguridad Alimentaria

Dra. Silvia Pichardo Sánchez
(spichardo@us.es)
Universidad de Sevilla. Sevilla.

Sección de Toxicología Veterinaria

Dr. Antonio Juan García-Fernández
(ajgf@um.es)
Universidad de Murcia. Murcia.

Sección de Toxicología Forense

Dra. María Luisa Soria Sánchez
(luisa.soria@mju.es)
Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias
Forenses. Sevilla.

Sección de Educación en Toxicología

Dra. Mónica Fernández Franzón
(Monica.Fernandez@uv.es)
Universidad de Valencia. Valencia.

Revista de Toxicología (Editada desde 1983)

Editor

Dr. GUILLERMO REPETTO KUHN
Universidad Pablo de Olavide. SEVILLA
E-mail: grepkuh@upo.es

Editoras Adjuntas

Dra. M^a DEL PRADO MÍGUEZ SANTIYÁN
Universidad de Extremadura. CÁCERES
E-mail: prado.miguez@gmail.com

Dra. M^a JOSÉ GONZÁLEZ MUÑOZ
Universidad de Alcalá. MADRID
E-mail: mariajose.gonzalez@uah.es