

## Una mirada desde Europa

### Una perspectiva Europea

#### *A European Perspective*

Marisa González Márquez<sup>1</sup>, Myriam Martín Vallejo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ministerio de Sanidad, España.

<sup>2</sup> Tragsatec, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, España.

#### DISMINUCIÓN DE LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL Y USO DE UN NUEVO ENFOQUE METODOLÓGICO

La experimentación con animales ha sido un tema controvertido desde sus inicios, puesto que el dolor infligido es evidente. Este reconocimiento no ha evitado su justificación, basándose en argumentos antropocéntricos, y no ha sido hasta la segunda mitad del siglo XX, cuando se han empezado a promover acciones legales para protegerlos del sufrimiento innecesario. El principio que inspira estas acciones es el proclamado por Russel y Burch en 1959, o modelo de las 3R. Lo que este paradigma propone es, en la medida de lo posible, **reemplazar** los ensayos con animales por ensayos sin animales, **reducir** el número de especímenes utilizados y **refinar** los métodos para disminuir el sufrimiento animal.

Los usos a los que se dedican estos animales van desde la investigación básica o aplicada, docencia, etc. Sin embargo, es en el uso regulatorio para cumplir los requerimientos de información en diferentes campos (medicamentos, cosméticos, aditivos alimentarios, etc.), y específicamente en el campo de las sustancias y mezclas químicas, en el que aquí nos centramos.

Actualmente, la mayoría de los organismos nacionales e internacionales cuya actividad lleva implícito el uso de animales de experimentación, han desarrollado directrices o regulaciones inspiradas en este compromiso de las 3R o enfoques similares. En esta reseña, vamos a focalizar nuestra atención en las acciones que lleva a cabo

la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA), como organismo regulatorio creado para asistir a la Comisión Europea en el campo de los químicos.

El Reglamento REACH<sup>a</sup>, establece, entre otras cosas, los requisitos de información necesarios para llevar a cabo la evaluación del riesgo de las sustancias y mezclas químicas, que son diferentes dependiendo del tonelaje que se comercializa en el territorio de la Unión Europea (UE), pero que implican en mayor o menor grado, experimentación animal.

Con objeto de promover los ensayos sin animales, el artículo 117.3 de este Reglamento, obliga a la ECHA a informar cada tres años a la Comisión sobre los avances alcanzados en este sentido, y ha sido en junio de 2023, cuando la ECHA ha emitido su quinto informe.

El Reglamento REACH prevé diferentes vías para evitar que los ensayos en animales sean excesivos. Por una parte, promoviendo la compartición de datos y la formación de agrupaciones de empresas, cuando estas comercializan la misma sustancia, que puede o no partir de distintos métodos de fabricación. También existe la posibilidad de justificar que se puede prescindir de las pruebas (dispensa), o bien utilizar adaptaciones para cumplir los requerimientos de información. Las adaptaciones pueden ser:

- Utilización de datos existentes. Se pueden admitir datos generados con anterioridad a la vigencia del Reglamento REACH por algunas circunstancias, como ensayos antiguos que no se llevaron a cabo bajo Buenas Prácticas de Laboratorio, pero cuyos resultados podrían considerarse válidos.
- Ponderación de las pruebas (*Weight of evidence*). La existencia de diferentes fuentes independientes, podría permitir, si se justifica adecuadamente, extraer una conclusión en relación con un requerimiento de información determinado.

<sup>a</sup> Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n.º 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.

- Relación cualitativa o cuantitativa estructura-actividad ((Q)SAR). El análisis de la relación entre la estructura y la actividad de una molécula se puede llevar a cabo mediante modelos estadísticos y matemáticos que se materializan en forma de herramientas informáticas.
- Métodos *in vitro*. Estos ensayos, para que sean aceptados, deben haber sido previamente validados por el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, por sus siglas en inglés).
- Agrupación de sustancias de estructura similar y extrapolación de datos (read-across). Las sustancias que tienen estructura similar, pueden agruparse cuando presentan propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas parecidas o siguen un patrón regular. En estos casos, es posible que se puedan predecir las propiedades fisicoquímicas, los efectos en la salud humana y en el medio ambiente, así como el destino final en el medio ambiente, a partir de datos relativos a una de ellas, que será la sustancia de referencia. De este modo, se evita la realización de ensayos con todas las sustancias para todos los parámetros.

La información periódica proporcionada por ECHA pone de manifiesto la efectividad de estas herramientas.

El informe emitido el pasado mes de junio por la Agencia cuenta además con una particularidad, y es que comprende un periodo de tiempo que ha sobrepasado la fecha límite para el registro por el Reglamento REACH de las sustancias existentes comercializadas en la UE, que fue 2018. Por tanto, el análisis recoge los resultados del registro de nuevas sustancias registradas entre 2019 y 2022, así como conclusiones finales del proceso de registro.

De los hallazgos señalados en el informe, destacamos los más relevantes:

- Las empresas que registran siguen prefiriendo utilizar adaptaciones de datos, más que ensayos experimentales. Dentro de ellas, la extrapolación (*read-across*), la justificación de la dispensa, la ponderación de pruebas y la herramienta QSAR son las más utilizadas.
- Más de la mitad de los ensayos experimentales disponibles en la base de datos de la ECHA, se llevaron a cabo con anterioridad a la publicación de REACH.
- Los métodos *in vitro* más utilizados y cuya utilización se incrementa progresivamente son aquellos dirigidos a establecer la capacidad de corrosión o irritación cutánea de las sustancias, el daño o la irritación ocular

y la sensibilización cutánea. Concretamente en el caso de la corrosión/irritación cutánea, el 50 % de los ensayos realizados en la década de los 90 eran *in vitro*, mientras que en la actualidad ha subido al 90 %.

- Actualmente se generan más datos mediante experimentación animal, para determinados requerimientos que pretenden establecer efectos a largo plazo, como pueden ser ensayos de toxicidad para el desarrollo prenatal o de toxicidad subcrónica por dosis repetidas.
- Se observa una tendencia a realizar ensayos que combinan distintos objetivos, por ejemplo, ensayos de toxicidad por dosis repetidas se combinan con pruebas de toxicidad para la reproducción.

En informe dedica su segunda parte a exponer el compromiso y los esfuerzos de ECHA para conseguir un sistema regulatorio para químicos industriales, sin ensayos animales, lo que se llevaría a cabo a través de los NAMs (*New Approach Methodologies*), o nuevos enfoques metodológicos, basados en los principios 3R.

La forma en la que ECHA promueve los NAMs se basa en tres pilares:

1. La implementación efectiva de los principios regulatorios de ECHA para identificar y abordar los riesgos de las sustancias de preocupación. Esto se lleva a cabo aplicando las diferentes vías mencionadas con anterioridad.
2. La inversión en colaboraciones y actividades internacionales que promueven alternativas a los ensayos animales. Entre estas iniciativas destacan:
  - La participación en la Asociación Europea para la Evaluación de Riesgos derivados de las sustancias químicas (*European Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals*) o PARC.
  - La integración en la iniciativa APCRA, o Aceleración del Ritmo de Evaluación del Riesgo Químico (*Accelerating the Pace of Chemical Risk Assessment*).
3. Garantizar que los datos toxicológicos y la información relacionada sean fácilmente accesibles para la comunidad científica y regulatoria en general, para facilitar la investigación y el desarrollo de NAMs.

Respecto a las iniciativas y colaboraciones mencionadas en el punto 2, hay que señalar la importancia de la participación de otras organizaciones, como la OCDE, cuyo objetivo es, entre otros, lograr la

mutua aceptación de datos en la evaluación de químicos entre los diferentes países que forman parte de dicha organización. La mutua aceptación de datos facilita el comercio entre países, pero tiene como requisito previo, acordar los ensayos considerados válidos para cumplir los requerimientos de información. Por esta razón, resulta imprescindible que los criterios sobre la validez de los NAMs sean compartidos por todos. La OCDE ha desarrollado la directriz IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*), de la cual, los NAMs constituyen un elemento básico.

Si el enfoque 3R representa una ventaja tan clara, no solo en lo que respecta a sufrimiento animal, sino también por el menor coste y mayor rapidez de los métodos alternativos ¿por qué no llevar a cabo una eliminación drástica?

Para entender las dificultades, hay que señalar que el actual paradigma aplicado para garantizar la seguridad en el uso de las sustancias químicas, se basa en determinar los peligros intrínsecos de dichas sustancias, y posteriormente, una vez conocidos los valores de las variables que se consideran de referencia, que se obtienen a partir de ensayos experimentales, se aplica una metodología de evaluación del riesgo, en base a modelos de exposición, para finalmente decidir si dicho riesgo es o no aceptable, y aplicar, si procede, medidas de mitigación.

Que las sustancias químicas tienen efectos sobre la salud de las personas, los animales o el medio ambiente, se ha evidenciado desde que empezaron a utilizarse. El desarrollo de la química, con la síntesis de nuevas moléculas y el aumento del conocimiento sobre los métodos de extracción y purificación de sustancias presentes en la naturaleza, nos ha llevado a rodearnos de una gran cantidad y variedad de químicos a los que estamos expuestos sin percibir los efectos que a largo plazo pueden tener sobre nuestro organismo. Y es que sus efectos no se limitan a los posibles peligros inminentes como pueden ser los derivados de sus propiedades fisicoquímicas como su inflamabilidad, capacidad oxidante o explosiva, su toxicidad aguda o la irritación o corrosión de la piel y ojos. También son frecuentes los problemas a largo plazo de salud humana, como la sensibilización, la toxicidad genérica o dirigida a determinados órganos, la incidencia de distintos tipos de cáncer; problemas de fertilidad y otros asociados a la reproducción, así como los de alteración endocrina, entre los que destacamos los de tiroides, aunque también se asocian a otras hormonas.

Desde el punto de vista medioambiental, los principales peligros intrínsecos asociados al uso de las sustancias se manifiestan en sus propiedades persistentes, es decir, difícilmente degradables, tóxicas

para organismos no objetivo o para ecosistemas, y/o bioacumulables. La bioacumulación se refiere a su capacidad de resistir su metabolización y eliminación, lo que provoca que finalmente se acumulen en los organismos superiores de la cadena trófica. Por otra parte, los efectos endocrinos pueden afectar también a los mamíferos y otros vertebrados.

Si bien la determinación de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias se lleva a cabo mediante ensayos químicos o instrumentales, no ocurre lo mismo con los efectos sobre la salud humana o del medio ambiente, que requieren en algunos casos estudiar el efecto sobre un animal, la mayoría de las veces roedores, anfibios o peces.

Y es que no existe un sistema experimental que recoja la complejidad del ser humano o de un ecosistema, sino es este mismo. Por esta razón resulta tan complejo reproducir en un tubo de ensayo o a través de un programa informático, lo que sucede en un ser vivo.

Uno de los proyectos más ambiciosos que se han llevado a cabo en este sentido, auspiciado por la OCDE, es el de desarrollar lo que se puede traducir como caminos de resultado adverso (*Adverse Outcome Pathways*). El método consiste en establecer una representación estructurada de eventos moleculares o celulares, que conducirían a un efecto adverso dentro de un organismo.

También la base de datos Toxcast/Tox21, promovida por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, contiene información sobre unas 9 000 sustancias químicas, que han sido sometidas a unos 1 400 ensayos *in vitro*. Esto permite la predicción de la toxicidad proporcionando información mecanicista para parámetros biológicos complejos.

Hay que señalar que los escollos para la implantación de los NAMs no son únicamente cuestiones científicas o técnicas, sino también regulatorias, ya que sería necesario modificar en profundidad todos los reglamentos que regulan la evaluación de las sustancias y mezclas químicas, para adaptarlos a este nuevo paradigma.

Para tratar estas y otras cuestiones relacionadas con el uso de los NAMs, la ECHA promovió un encuentro los días 31 de mayo y 1 de junio en Helsinki, en el que se reunieron expertos de distintos campos para debatir sobre nuevos enfoques metodológicos alternativos a la experimentación animal.

El lema de la reunión era *Hacia a un sistema regulador sin animales para la evaluación de la seguridad química*, lo que da una idea de que finalidad del mismo era facilitar la transición.

Los NAMs incluyen una serie de métodos tanto *in vitro* como *in chemico*, así como modelos computacionales *in silico*, y están consideradas como la herramienta más prometedora para sustituir en última instancia al uso de animales en la seguridad química.

Sin embargo, la eliminación progresiva de los ensayos en animales no es el único objetivo por el que se plantea el uso de los NAMs. También se considera una ventaja la capitalización de los avances logrados en biología molecular, toxicología mecanicista, *big data* e inteligencia artificial, entre otras muchas áreas. A lo anterior, se une la posibilidad de reducir costes y aumentar el rendimiento de las pruebas.

Aparte de las motivaciones para el uso de los NAMs, en la reunión se mostraron ejemplos de su aplicación. También se puso de manifiesto su estado actual de desarrollo y las soluciones a las necesidades para su aplicación en la evaluación de la seguridad química. Respecto a este último punto, se destacaron los siguientes elementos:

- A. Necesidad de ofrecer una visión global para superar las objeciones o reticencias a la aplicación de NAMs. Esta necesidad está enfocada a ofrecer una visión global con expectativas realistas y demostrar confianza en su uso. En línea con este aspecto, están los objetivos de la Estrategia para la Sostenibilidad de las Sustancias Químicas de la Unión Europea, y podrían aplicarse a los requisitos de información que se van a solicitar a las sustancias de menor tonelaje, así como a determinar las que son de preocupación, como los posibles alteradores endocrinos. En esta visión global, hay que distinguir las expectativas y objetivos a corto y a largo plazo. Se hizo especial mención a las baterías de NAMs organizadas dentro de estrategias de ensayo, o planteamientos escalonados.
- B. Necesidades técnicas para la aplicación de los NAMs. Para que estas técnicas puedan ser utilizadas, es necesario que sean reproducibles y se obtengan resultados fiables, por lo que deberán estar normalizadas, preferentemente en el marco de la OCDE. Para que sean fiables, debe demostrarse su precisión y pertinencia, que se deberán tener en cuenta en el proceso de validación. Se admite que los NAMs no tienen por qué tener el mismo valor predictivo que los ensayos con animales. En muchas ocasiones, tienen capacidad para identificar un peligro, pero es más difícil identificar la ausencia de dicho peligro.
- C. Aceptación de los NAMs. En este punto, la OCDE sugirió algunos elementos críticos para favorecer la aceptación internacional:
- El desarrollo de definiciones y entendimiento comunes en los NAMs.
  - El desarrollo de normas para evaluar la idoneidad de las técnicas, que deben demostrar reproducibilidad y relevancia.
  - Demostración clara del contexto de uso, a través de una variedad de escenarios regulatorios.
  - Identificación de los aspectos de los NAMs que puedan ser estandarizados.
- D. Adaptación de los marcos reguladores. Si bien la adaptación de las regulaciones a los NAMs es un objetivo a largo plazo, ECHA hace las siguientes consideraciones:
- Deben identificarse las necesidades críticas a los que debe dirigirse el desarrollo de los NAMs.
  - En los marcos normativos actuales, ya es posible aplicar algunos de los NAMs disponibles. En este sentido, la extrapolación merece especial atención.
  - Es necesaria una redefinición a largo plazo de la regulación para la evaluación de la seguridad química.
  - Hay que señalar que la Comisión ha iniciado los procedimientos pertinentes para la modificación de los Reglamentos REACH y CLP.
- E. Seguridad jurídica. Es un elemento necesario para que las compañías puedan cumplir sus obligaciones, y las autoridades sean capaces de llevar a cabo sus evaluaciones, aceptando las exenciones, adaptaciones, propuestas de ensayo, etc., basadas en este nuevo enfoque.
- F. Validación de NAMs. Es un aspecto fundamental para su aceptación, y que esta esté basada en fundamentos científicos robustos. La validación, asimismo, mantiene la integridad científica, la credibilidad y la utilidad de la técnica en cuestión. Los principios de validación actuales están definidos en el Documento de orientación (GD) 34 de la OCDE, y establece que "*el proceso de validación debe ser flexible y adaptable*", el rendimiento debe "*demostrarse utilizando una serie de sustancias químicas de referencia*", y "*evaluarse en relación con los datos de toxicidad relevantes existentes*" (OCDE, 2005).
- G. Aceptación mutua de datos. Con objeto de que un mismo ensayo sea aceptado en todos los sistemas

regulatorios, es preciso que los NAMs estén armonizados a nivel internacional, preferiblemente en el marco de la OCDE, que es el principal organismo trabajando en este campo.

- H. Formación y capacitación. Además de formar a los usuarios de los NAMs, es necesario aumentar la concienciación acerca de estas metodologías; involucrando a todos los grupos de interés, incluidos los consumidores. Tampoco hay que olvidar la integración de los NAMs en la formación científica básica, especialmente en cursos universitarios de grado y posgrado.
- I. Necesidad de una hoja de ruta para sustituir los ensayos con animales. Hace falta, al menos en la UE, definir los pasos necesarios para sustituir los ensayos con animales. Se citó como ejemplo el *“Desarrollo de una hoja de ruta para la acción sobre las NAMs en la evaluación de riesgos”*, de la EFSA. Para ellos, es necesaria una inversión y financiación adecuadas. Los Programas Marco de la UE, han demostrado que son clave para promover la innovación en este tipo de iniciativas.

## CONCLUSIONES DE LA REUNIÓN

Se ha puesto de manifiesto el fuerte compromiso de todas las partes implicadas en el objetivo. El punto clave del debate es la necesidad de crear e implementar una hoja de ruta que identifique los pasos clave para lograr la aceptación, lo que debe llevarse a cabo fomentando el diálogo de las partes interesadas, incluyendo la industria y el sector gubernamental, para propiciar un acuerdo a nivel global. También se destaca la necesidad de la adaptación de los marcos regulatorios implicados y de cumplir con los objetivos a medio y largo plazo para alcanzar la aceptación de los NAMs por todas las partes interesadas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. European Chemicals Agency. The use of alternatives to testing on animals for the REACH Regulation. June, 2023 [citado el 29 de noviembre de 2012] Disponible en: [https://echa.europa.eu/documents/10162/23919267/230530\\_117\\_3\\_alternatives\\_test\\_animals\\_2023\\_en.pdf/9cfc291e-9baf-ffa2-466c-2bc2c6f06b8e?t=1685428213290](https://echa.europa.eu/documents/10162/23919267/230530_117_3_alternatives_test_animals_2023_en.pdf/9cfc291e-9baf-ffa2-466c-2bc2c6f06b8e?t=1685428213290).
2. European Chemicals Agency. Report on the European Chemicals Agency's "New Approach Methodologies Workshop: Towards an Animal Free Regulatory System for Industrial Chemicals" 31 May – 1 June 2023, Helsinki, Finland [citado el 29 de noviembre de 2012] Disponible en: [https://echa.europa.eu/documents/10162/17220/nams\\_ws\\_june2023\\_en.pdf/06b8bc28-c563-3a36-cfa9-0fa5453b88a7?t=1695620290072](https://echa.europa.eu/documents/10162/17220/nams_ws_june2023_en.pdf/06b8bc28-c563-3a36-cfa9-0fa5453b88a7?t=1695620290072).