

Necesidad de la experimentación animal en toxicología

Necessidade de experimentação animal em toxicologia

The need for animal experiments in toxicology

Eduardo de la Peña de Torres.

Investigador del CSIC.

Miembro Fundador de la Red Española de Métodos Alternativos REMA.

Miembro de AETOX, SEMA, REMA y SESA.

(epena@ica.csic.es)

En memoria de nuestro recordado amigo Joan Albert Vericat de REMA

Resumen

Se hace una reflexión sobre el nuevo Real Decreto 53/2013 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; de acuerdo con la Ley 32/2007 solo se podrán utilizar animales cuando su uso esté justificado por la finalidad que se persigue, valorando su oportunidad siempre en términos de sus potenciales beneficios. Se establece como principio general la promoción e implantación del principio de las tres erres, el reemplazo, la reducción y el refinamiento de los procedimientos, en la evaluación toxicológica de nuevas sustancias, fomentando el de métodos alternativos a la experimentación con animales vivos, cuando ello lo permita. Por tanto vamos a considerar el desarrollo legislativo, la necesidad de la experimentación animal, los métodos alternativos y el proceso docente de la formación del personal que esté implicado. La conclusión definitiva es que la evaluación toxicológica por el momento no puede prescindir totalmente del uso de animales de experimentación.

Palabras Clave: Toxicología; experimentación animal; métodos alternativos; legislación

1. El tratado de Funcionamiento de la Unión Europea incluye dentro de las disposiciones de aplicación general, en el artículo 13, la obligación de la Unión y de los Estados miembros de tener en cuenta el bienestar de los animales, aplicada a la política de investigación, desarrollo tecnológico y de mercado interior. En 2010 el Parlamento Europeo y Consejo adoptaron la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos y se debe incorporar al ordenamiento jurídico, que derogaba la Directiva 86/609/CE relativa a la aproximación de las disposiciones legales respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Por otra parte la Comisión Europea, a través de la Recomendación 2007/526/CE, establecía las directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y establece como principio último la promoción e implantación del principio de las tres erres, el reemplazo, la reducción y el refinamiento de los procedimientos, fomentando el uso de los métodos alternativos a la experimentación con animales vivos.

La protección que otorga esta regulación no puede extenderse hoy a los nuevos animales hasta que se reforme la Ley 32/2007 para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, esta norma se aprueba de manera que su protección se extenderá cuando se introduzca el cambio previsto en la citada Ley, y se aplicara al régimen sancionador; solo se podrán utilizar animales cuando su uso esté justificado por la finalidad que se persigue, valorando la oportunidad siempre en términos de sus potenciales beneficios.

Se marca como objetivo último el total reemplazo de los animales en los procedimientos y se fijan normas específicas para la utilización de animales; se introducen relevantes cambios en los requisitos formales de control a los que se deben someter los proyectos y procedimientos en los que se utilicen animales vivos, se regula la necesidad de evaluación previa de los proyectos, y se establecen asimismo los criterios básicos en cuanto a la capacitación necesaria para la realización de determinadas funciones.

Otras novedades de importancia son la creación de comités nacionales de bienestar, y de puntos de contacto

nacionales de bienestar y de coordinación en materia de implementación de normas de protección y de los métodos alternativos y la obligatoriedad de que todos los criadores, suministradores y usuarios dispongan de órganos encargados del bienestar de los animales. Quedan lagunas sin normalizar, como la acreditación de la formación. Por todo ello, se ha determinado la conveniencia de promulgar una nueva norma que con rango de real decreto derogue y sustituya al Real Decreto 1201/2005, sobre protección de los animales vertebrados utilizados con estos fines u otros fines científicos.

Las disposiciones generales del Real Decreto 53/2013 determinan las normas aplicables para la protección de los animales utilizados, criados, o suministrados con fines científicos, incluyendo la educación y docencia a los usuarios. Por ello se regula: *a)* el reemplazo y reducción de la utilización de animales en procedimientos y el refinamiento de la cría, el alojamiento, el cuidado y la utilización de animales en tales procedimientos; *b)* el origen de la cría, el marcado, los cuidados, el alojamiento y la eutanasia de los animales; *c)* las actividades de los criadores, suministradores o usuarios; *d)* la evaluación y autorización de los procedimientos con animales; por ello la finalidad de asegurar dicha protección y, en particular, que el número de animales utilizados en los procedimientos se reduzca al mínimo, aplicando en lo posible los métodos alternativos; que no le cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero; que se evite la duplicación inútil de procedimientos; y que a los animales utilizados, criados y suministrados se les concedan los cuidados adecuados.

2. La experimentación animal se hace necesaria en la realización de ensayos toxicológicos, que son requeridos por la legislación existente, entre otros, productos farmacéuticos, plaguicidas, productos fitosanitarios, y las sustancias y mezclas¹. Como lo indican el Reglamento (CE) 1907/2006 del REACH, el Reglamento (CE) 440/2008 que establece los métodos de ensayo y el Reglamento (UE) 640/2012 que los modifica con vistas a su adaptación al progreso técnico.

En general son preceptivas las pruebas siguientes:

- Toxicidad aguda (dos vías de administración y al menos en dos especies animales).
- Toxicidad subaguda (dos especies animales, vía de administración considerada en humanos, y 2 a 4 semanas).
- Toxicidad subcrónica (dos especies animales, vía de administración considerada en humanos, 13 semanas, 1 semana de recuperación).

- Toxicocinética (una o dos especies, 2 a 4 semanas).
- Toxicidad crónica (dos especies animales, vía de administración considerada en humanos, entre 6 meses y 1 año, 4 semanas de recuperación).
- Carcinogénesis (dos especies animales -rata y ratón-, vía de administración oral en el pienso, entre 18 meses y 2 años).
- Teratogenia (dos especies animales -rata y conejo-, vía de administración considerada en humanos, administración del fármaco durante la gestación).
- Fertilidad (una especie animal -rata-, machos y hembras, administración antes y después del apareamiento).
- Toxicidad peri y postnatal.
- Mutagénesis: sistemas bacterianos con o sin activación metabólica microsomal.

Pueden ser necesarias algunas pruebas adicionales como son las siguientes:

- Toxicidad por inhalación
- Irritación ocular
- Irritación dermal
- Irritación intravenosa, intraarterial o perivenosa
- Fototoxicidad, etc.

Las vacunas, los productos derivados de biotecnología, los fármacos anticancerosos, y los productos para la terapia génica, requieren estudios toxicológicos independientes, especialmente diseñados para ellos. La mayor parte de las veces, estos estudios se realizan en centros especializados de investigación por contrato.

Los requerimientos para las sustancias con respecto a la demanda que solicita el Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias Químicas (REACH) hacen necesario el uso de animales.

La gran mayoría de los procedimientos hacen que sea indispensable el uso de animales de experimentación cuando no existe alguna prueba o método alternativo al empleo de animales de la experimentación vivos.

3. Los métodos alternativos se han desarrollado fundamentalmente por la loable actividad de los grupos

protectores y amantes de los animales y por la activa sensibilidad social. En los últimos años se ha manifestado una creciente sensibilización social en las cuestiones vinculadas al medio ambiente y a la protección y bienestar animal. El constante avance de la investigación en todos los ámbitos de las ciencias y de la tecnología ha puesto de relieve una mayor concienciación de la necesidad de extender la reflexión social sobre los problemas éticos relacionados con la utilización de los animales en la experimentación, tema que se reconoce, y que ha trascendido del círculo estricto de la comunidad científica para alcanzar un ámbito social más amplio. En este sentido se constituyó la Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal (REMA; <http://www.remanet.net/index.htm>)².

REMA desde, que en 1999 inició su actividad, es 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*, y conseguir una mejor y eficaz aplicación de los tres principios de *reducción, refinamiento y reemplazo*, del uso de animales en la experimentación.

La Constitución de REMA ha transcurrido en dos fases perfectamente diferenciadas. El primer periodo se inició el 21 de octubre de 1997 en la "Reunión para el desarrollo y la coordinación con ECVAM (*European Centre for the Validation Alternative Methods*) de los grupos españoles interesados en métodos alternativos" celebrada en Madrid bajo la Presidencia de Honor de Su Majestad la Reina, en donde se constituyó una Comisión Promotora integrada por seis representantes de los distintos sectores (Dres. Adela López de Cerain, Eugenio Vilanova, José V. Castell, Domingo Gargallo, Guillermo Repetto, y Eduardo de la Peña).

El trabajo realizado por esta comisión quedó plasmado en un Documento sobre la constitución de REMA³ con la representación y el apoyo de los cuatro sectores implicados en el interés por la utilización de los métodos alternativos: mundo científico, administración (Ministerios de Sanidad y Agricultura y Medioambiente), movimientos sociales (protección animal, consumidores).

El segundo periodo concluyó con la celebración de la "Jornada Científica para la Constitución y Puesta en Marcha de REMA", el 1 de diciembre de 1999 en el Ministerio de Sanidad y Consumo; desde entonces se han realizado varias reuniones de las que hay que destacar la celebrada el 16 de enero de 2000 de REMA, que se organizó en Madrid en el Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC, una reunión *in memoriam* de nuestro recordado Joan Albert Vericat, que coincidió con la VI Jornada de REMA.

La complementariedad de los métodos alternativos se materializó con la celebración del "Grupo de Trabajo de ICLAS/CSIC sobre Métodos Complementarios" en Talavera de la Reina en 1995⁴.

Repetto^{5,6} propuso una clasificación de los métodos alternativos y dicha clasificación fue adoptada por REMA:

1. Evitar la repetición innecesaria de experimentos:

- Protocolos de ensayo y estudios previos: disponibilidad de la información
- Intercambio y aceptación legal

2. Mejoras de diseño en la experimentación animal:

- Reducción en el número de animales usados
- Refinamiento: disminución estrés y sufrimiento

3. Estudios en humanos:

- Epidemiológicos
- Toxicovigilancia
- Voluntarios

4. Técnicas *in vitro*:

- Cultivo de embriones
- Cultivo y baños de órganos
- Órganos perfundidos
- Explantes. Cultivos organotípicos
- Cultivo de reagregados celulares
- Cultivo de células dispersadas
- Cultivo de líneas celulares
- Modelos libres de células
- Organismos inferiores: bacterias, algas, etc.

5. Modelos teóricos de predicción:

- Relación estructura química y actividad (QSAR)
- Fármaco-toxicocinética (PB-PK)

6. Otros. Modelos en la enseñanza:

- Modelos mecánicos
- Sistemas audiovisuales
- Simulaciones por ordenador y de realidad virtual

La Agencia Europea de Compuestos Químicos (ECHA) tiene una Guía de alternativas a la experimentación animal. Los interesados en métodos alternativos puede

consultar la página web <http://buscaalternativas.com>, coordinada por el Dr. Repetto G.

4. Para el empleo de animales de experimentación se hace necesario establecer los requisitos mínimos relativos a la educación y formación del personal, que se especifican en el Anexo VII del Real Decreto 53/2013 donde se incluye la docencia con respecto a:

1. Normativa nacional en vigor relacionada con la adquisición, zootecnia, cuidados y utilización de animales para fines científicos.

2. Principios éticos de la relación entre los seres humanos y los animales, valor intrínseco de la vida y argumentos a favor y en contra de la utilización de animales para fines científicos.

3. Biología fundamental y ajustada a cada una de las especies en relación con la anatomía, los aspectos fisiológicos, la reproducción, la genética y las modificaciones.

4. Etiología, zootecnia y enriquecimiento ambiental.

5. Métodos para el manejo de cada una de las especies y procedimientos, cuando proceda.

6. Gestión de la salud e higiene de los animales.

7. Reconocimiento de la angustia, dolor y sufrimiento característicos de las especies más comunes de animales de laboratorio.

8. Anestesia, métodos para calmar el dolor y eutanasia.

9. Uso de puntos finales humanitarios.

10. Requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento.

11. Diseño de procedimientos y proyectos, cuando proceda.

5. La conclusión es que los estudios de evaluación y valoración toxicológica de toda sustancia o mezcla, hace necesario el uso racional, ético y regulado de los animales de experimentación, y este requisito no anula el posible empleo de alguno de los métodos alternativos a la experimentación animal. Por ello, aún siendo un total entusiasta defensor del empleo de estas pruebas y procedimientos alternativos, considero que son por ahora tan solo un complemento del empleo de animales *in vivo*, sin ellos no es posible realizar pruebas toxicológicas si el procedimiento los requieren y es imposible el realizarlas sin los citados animales de experimentación, y esto por ahora es aún una necesidad.

El pasado 12 de junio se ha publicado la Ley 6/2013 de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. M^a Luisa Pita por animarme a presentar esta aportación y a la Dra. Covadonga Caballo y al Dr. Guillermo Repetto por su ayuda y la colaboración de Dña. Antonia Martínez, Ayudante Diplomada de Investigación del CSIC.

REFERENCIAS

1. De la Peña E, Pillco A, Hazen MJ. Toxicological Evaluation Strategy pair of Complex Mixtures by Alternative Methods. Supplement to Toxicological Sciences. SOT 2012 Annual Meeting. 2012;233.
2. De la Peña E, Guadaño A. Evolution and coordination of the alternative methods in Spain. *Science Total Environ* 2000;247:333-5.
3. REMA. Documento de la constitución de REMA. *Rev. Toxicol.* 1998;5:133-42.
4. De la Peña E, Guadaño A, Barrueco C, Repetto G, González-Menció F, García P (Comité Español del ICLAS/CICYT/CSIC). Working Group on Complementary Methods. Madrid: Dirección General de Investigación Científica y Técnica. 1995.
5. Repetto G, Repetto M. Métodos alternativos: estudios toxicológicos *in vitro*. En: Repetto M. *Toxicología Avanzada*. Madrid: Díaz de Santos. 1995:37-59.
6. Repetto G. Recientes avances en la validación y aceptación de los métodos alternativos *in vivo* e *in vitro*. *Rev. Toxicol.* 1995;12:1-9.
7. Webs:
AETOX: <http://aetox.es>.
REMA: <http://www.remanet.net/index.htm>.
RITSQ: <http://ritsq.org>.