



ToxEcotox
2019

II Jornadas Científicas de Toxicología Ambiental y Ecotoxicología
31 de enero de 2019
Salón de Actos
Instituto de Ciencias Agrarias
CSIC

Desarrollo de métodos alternativos a la Experimentación Animal en Toxicología Ambiental

Guillermo Repetto
Área de Toxicología

Presidente REMA <http://www.remanet.net>
<http://buscaalternativas.com>

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

Tipos de Estudios en Ecotoxicología y Toxicología Ambiental

1 RETROSPECTIVOS Y DE MONITORIZACIÓN:
- Concentración, cinética y bioacumulación
- Biomarcadores de exposición y efecto.

2 PROSPECTIVOS:
- En una especie /Toxicidad aguda y crónica /Cinética
- Multiespecie: - microcosmos /Especies sensibles
- mesocosmos / Mecanismos
- Métodos in vitro
- Métodos in silico e in chemico

Sustancias, agua, sedimento, suelo, residuos.




Guillermo Repetto
Universidad Pablo de Olavide

Principio de reemplazo, reducción y refinamiento. Art. 4 RD 53/2013, de protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (Directiva 2010/63/UE)

• Investigadores:


- ♦ 1. Utilizarán **siempre que sea posible** métodos o estrategias de ensayo científicamente satisfactorios que **no conlleven la utilización de animales vivos**.
- ♦ 2. El número de animales utilizados se **reducirá**...
- ♦ 3. se **refinarán** para eliminar o reducir dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero
- ♦ 4. En la **elección de los métodos**, el principio de reemplazo, reducción y refinamiento...



• Administración:

- ♦ 5. Los **órganos competentes** se asegurarán de la **aplicación** de los apartados anteriores y **contribuirán al desarrollo y validación de planteamientos alternativos**...
- ♦ 6. La **Administración General del Estado y los órganos competentes fomentarán la investigación y promoverán los planteamientos alternativos y la difusión de información**.

ES 3: Evaluación de los peligros para el medio ambiente (Reg CLP (1272/2008))



Clasifica a las sustancias:

1. Peligroso para el medio ambiente acuático

Los elementos básicos de clasificación de los peligros para el medio ambiente acuático son:

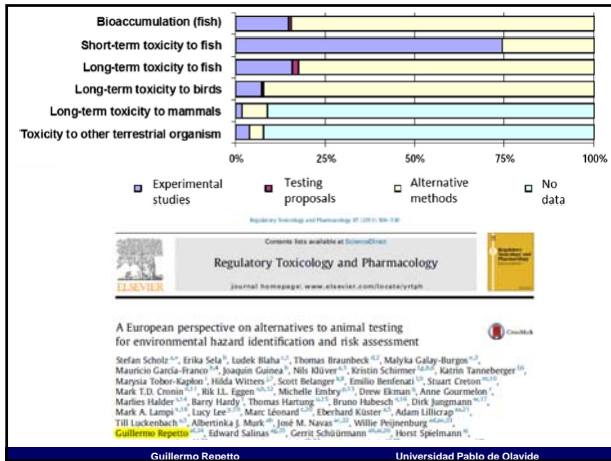
- Toxicidad acuática aguda;
- Capacidad de bioacumulación;
- Degradación (biótica o abiótica) de productos químicos orgánicos; y
- Toxicidad acuática crónica.

Se desglosa en:

— Peligro agudo para el medio ambiente acuático: categorías en función de la CL50

Peligro crónico (a largo plazo) para el medio ambiente acuático: 4 categorías basadas en la toxicidad aguda, degradabilidad y bioacumulación. Calcula la Concentración prevista sin efecto (PNEC)

Guillermo Repetto
Universidad Pablo de Olavide



Directrices OCDE. 2. - Efectos en sistemas bióticos (>2010)

- 201: Inhibición del crecimiento en algas de agua dulce y cianobacterias (2011)
- 209 Lodos activados, test de inhibición de la respiración (2010)
- 210 Toxicidad en etapas tempranas de la vida en pez (2013)
- 211 Ensayo de Reproducción en *Daphnia magna* (2012)
- 220 Test de reproducción en *Enchytraeidae* (2016)
- 222 Test de reproducción en lombriz de tierra (*Eisenia fetida/andrei*) (2016)
- 223 Ensayo de toxicidad oral aguda en aves (2010)
- 226 Ensayo de reproducción de ácaros en suelo (2016)
- 228 Determinación de la toxicidad para el desarrollo sobre dípteros (2016)
- 229 Ensayo corto de reproducción en pez (2012)
- 232 Ensayo de reproducción de coelobolos en tierra (2015)
- 233 Ensayo de ciclo de vida sedimentos-agua en quironómidos (2010)
- 234: Ensayo de desarrollo Sexual en peces (2011)

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

Directrices OCDE. 2. - Efectos en sistemas bióticos (>2010)

- 236: Ensayo de toxicidad aguda en embrión de pez (FET) 2013
- 237: Ensayo de toxicidad en larva de abeja (*Apis Mellifera*), 1 Expo 2013
- 238: Ensayo de toxicidad sin Sedimento en *Myriophyllum Spicatum* 2014
- 239: Ensayo de toxicidad agua-sedimento en *Myriophyllum Spicatum* 2014
- 240: Ensayo extendido de reproducción en una generación de Medaka 2015
- 241: Ensayo de crecimiento y desarrollo de larva de anfibios (LAGDA) 2015
- 242: *Potamopyrgus antipodarum* test de Reproducción 2017
- 243: *Lymnaea stagnalis* Test de Reproducción 2017
- 244: Ensayo de inhibición de lodos activados en Protozoo 2017
- 245: Abeja (*Apis Mellifera* L.), Toxicidad crónica oral (10-Dias alime) 2017
- 246: Abejorro, Test de Toxicidad aguda por contacto 2017
- 247: Abejorro, Test de Toxicidad aguda oral 2017

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

Directrices OCDE. Sección 3 - Destino y comportamiento ambiental (cambio de denominación en 2017)(>2010)

- 301 Biodegradabilidad inherente
- 305 Bioconcentración en pez: agua y dieta (2012)
- 310 Biodegradabilidad facil - CO2 en fiasco cerrado (espacio en cabeza) (2014)
- 317 Bioacumulación en *Oligochaetes* Terrestres 2010
- 318: Estabilidad de la dispersión de Nanomateriales en medio ambiental simulado 2017
- 319A: Determinación del aclaramiento intrínseco in vitro utilizando hepatocitos de trucha arco iris criopreservados (RT-HEP) 2018
- 319B: Determinación del aclaramiento intrínseco in vitro utilizando la fracción subcelular S9 del hígado de trucha arco iris (RT-S9) 2018

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

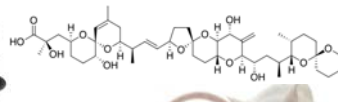
Publicaciones OECD ensayo y evaluación: 179 docs >2010

- No. 296 Considerations for Assessing the Risks of Combined Exposure to Multiple Chemicals (Glossy - MONO)
- No. 288 Guidance Document on Use and Development of Tier-2 Laboratory Based Tests used to Substantiate Claims for Efficacy of Biocide Treated Articles
- No. 268 Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation
- No. 266 Effects of chemicals on waste water treatment: Final validation study of the protozoan activated sludge test to establish an OECD Test Guideline
- No. 264 Guidance Document on Aspects of OECD TG 305 on Fish Bioaccumulation
- No. 259 Guidance on the Incorporation of Bioavailability Concepts for Assessing the Chemical Ecological Risk and/or Environmental Threshold Values of Metals and Inorganic Metal Compounds
- No. 254 Case Study on the Use of an Integrated Approach for Testing and Assessment of the Bioaccumulation Potential of Degradation Products of 4,4'-Bis (Chloromethyl)-1,1'-Biphenyl
- No. 236 Lynnea validation report
- No. 235 Potamopyrgus validation report
- No. 232 Guidance Document for Conducting Pesticide Terrestrial Field Dissipation Studies
- No. 228 Guidance Document on Histopathology Techniques and Evaluation for the Larval Amphibian Growth and Development Assay (Lagidis - Part 1, Part 2, Part 3)
- No. 223 Guidance Document for Storage Stability Testing of Plant Protection and Biocidal Products
- No. 212 Guidance on Selecting a Strategy for Assessing the Ecological risk of Organometallic and Organic Metal Salt Substances based on their Environmental Fate
- No. 207 New Scoping Document on in vitro and ex vivo Assays for the Identification of Modulators of Thyroid Hormone Signalling
- No. 206 Myriophyllum Toxicity Test: Results of Ring Test Using M. Aquaticum and M. Spicatum in a Sediment-Water System - Ring Test Report
- No. 201 New Guidance Document on Harpacticoid Copepod Development and Reproduction Test with Amphiascus
- No. 191 Validation Report of a Ring Test for the OECD 305 Dietary Exposure Bioaccumulation Fish Test, Additional Report Including Results Using a Lower Feeding Rate
- No. 187 Guidance Document on Quantitative Methods for Evaluating the Activity of Microbicides Used on Hard Non-Porous Surfaces
- No. 186 Guidance Document on the Testing of Efficacy of Baits, for Indoor Use, against Garden Ants
- No. 185 Guidance Document for Exposure Assessment Based on Environmental Monitoring Data

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

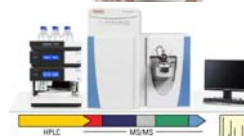
Detección de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos bivalvos vivos



- **Sustitución** a partir de 2015 del bioensayo



- **Por un sistema analítico -la cromatografía líquida con detección de masas (LC-MS/MS)**



Reglamento (UE) N° 15/2011 de la Comisión que modifica el Reglamento (CE) n o 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

Uso del Umbral de preocupación toxicológica (eco-TTC) en la evaluación de la toxicidad acuática

- Se ha propuesto para la evaluación del riesgo ambiental como una extensión del concepto de TTC de seguridad humana (Belanger et al., 2015).
- El TTC en humanos es un límite por debajo del cual no se espera riesgo significativo del compuesto. Puede aplicarse si la exposición es menor de 0.15 microg/día y nunca para carcinógenos potentes con estructura de alerta genotóxica,
- Se han desarrollado y abierto en 2018 (HESI):
 - EnviroTox (<https://envirotoxdatabase.org/>): base de datos de >91,000 registros ecotoxicológicos, 4,000 productos químicos y 1,500 especies de tres niveles tróficos (peces, invertebrados, algas/ plantas).
 - Una herramienta analítica para calcular en línea los valores umbral basados en distribuciones estadísticas de dos tipos, la distribución de concentración prevista sin efecto (PNEC) o la distribución de datos ecotoxicológicos, de acuerdo con criterios particulares.

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

Recomendación EURL-ECVAM 2013

Uso del Ensayo de citotoxicidad de la Captación de Rojo Neutro en 3T3 (3T3 NRU) para la identificación de sustancias que no requieren clasificación para la Toxicidad Aguda por Vía Oral (LD50 > 2000 mg/kg) de acuerdo con el CLP.

Se puede utilizar como parte de una evaluación del peso de la evidencia para evitar el requisito de un estudio de toxicidad oral aguda

Food Safety Research, 2013, 4(4):363-364-65. doi:10.1016/j.fsr.2012.11.013. Issue 2012 Dec 13

Assessment of the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity (LD50>2000 mg/kg): results of an ECVAM validation study.

Franke P,¹ Castejón S,² Gohou JM,³ Leinisch M,⁴ Rindler-Schjerve AM,⁵ Vitharana M,⁶ Vitorica-Gil C,⁷ Chikara S,⁸

Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity

Guillermo Repetto, Ana del Pozo B, Sergio J. Zarba

Table 2: Correlation coefficients between EC50 values for various chemicals obtained with established fish cell lines and LC50 data obtained with *in vivo* tests

Fish cell line	Endpoint	Fish species	n	r	r ²	Chemical class	Reference
FHM	NRU	Golden orfe	49	0.89	0.79	Heterogeneous	81
GFS	NRU	Carp	18	0.69	0.48	Organophosphate pesticides	83
GFS	NRU	Carp	84	0.85	0.72	Pesticides	85
GFS	NRU	Fathead minnow	31	0.98	0.92	Narcotics, anilines, phenols	228
GFS	NRU	Guppy	29	0.96	0.92	Aldehydes and pesticides	226
GFS	MTT	Goldfish	7	0.96	0.98	Chlorophenols	227
GFS	MTT	Medaka	15	0.92	0.84	Chlorophenols	227
GFS	MTT	Guppy	8	0.96	0.92	Chlorophenols	227
RTG-2	ATP content	Rainbow trout	26	0.97	0.94	Heterogeneous	80
RTG-2	NRU	Rainbow trout	26	0.98	0.96	Heterogeneous	80
RTG-2	Cell detachment	Rainbow trout	26	0.98	0.96	Heterogeneous	80
BO/F	NRU	Rainbow trout	4	0.98	0.96	Organo-mercurial compounds	18
RTG-2	Cell attachment	Rainbow trout	9	0.92	0.85	Phenols, benzenes, anilines	91
RTG-2	MTT	Zebra fish	5	0.95	0.90	Heterogeneous	228
RTG-2	NRU	Zebra fish	4	0.99	0.98	Heterogeneous	228
PLHC-1	MTT	Medaka	9	0.80	0.64	Organo tin compounds	229
PLHC-1	NRU	Medaka	8	0.88	0.74	Organo tin compounds	229
BO/F	NRU	Platessa	4	0.99	0.98	Organo lead compounds	280
FHM	Total protein content	Golden orfe	25	0.90	0.81	Heterogeneous	78

ATLA 31, 317-351, 2003

The Use of Fish Cells in Ecotoxicology

The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 47^{1,2}

Argelia Castaño,³ Niels Bols,⁴ Thomas Braunbeck,⁵ Paul Dierckx,⁶ Marlies Halder,⁷ Boris Isomaa,⁸ Kazumi Kawahara,⁹ Lucy E. J. Lee,¹⁰ Carmel Motherhill,¹¹ Peter Pärt,¹² Guillermo Repetto,¹³ Juan Riego Sintes,¹⁴ Hans Ruffli,¹⁵ Richard Smith,¹⁶ Chris Wood¹⁶ and Helmut Segner¹⁷

Guillermo Repetto Universidad Pablo de Olavide

Base de datos de biotransformación EURL ECVAM (2018)

- Contiene datos de biotransformación *in vivo* e *in vitro* de varias especies (ratón, rata, pez)
- Valiosa para desarrolladores de modelos (Ej. modelos de extrapolación *in vitro* a *in vivo*, modelos cinéticos, modelos para predecir la exposición y la concentración interna en un organismo) así como para evaluadores químicos. (Halder et al., 2018).
- [Http://data.jrc.ec.europa.eu/dataset/jrc-eurl-ecvam-fish-in-vitro-intr-clear](http://data.jrc.ec.europa.eu/dataset/jrc-eurl-ecvam-fish-in-vitro-intr-clear)

Guillermo Repetto Universidad Pablo de Olavide

Nuevas Directrices de ensayo 319ayb y guía 280 de la OCDE para la determinación *in vitro* del aclaramiento hepático intrínseco en peces (2018)

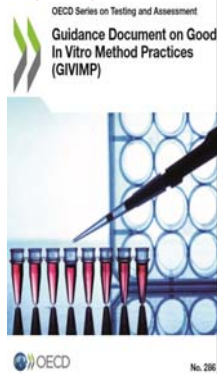
- Dos métodos *in vitro* que utilizan trucha arco iris (Nichols et al., 2018):
 - Fracción subcelular S9 (Johanning et al., 2012) o
 - Hepatocitos crioconservados (Fay et al., 2015)
- + Documento de orientación de la OCDE 280 (OCDE, 2018):
 - Facilita su aplicación.
 - Describe la extrapolación del aclaramiento intrínseco *in vitro* al metabolismo de todo el cuerpo, lo que mejora la predicción de los sistemas *in silico*.
- Incluye la cuantificación de la biotransformación, lo que aumenta la fiabilidad de los modelos, ya que los QSAR basados en log Kow convencionales u otros modelos a menudo descuidan la contribución de la biotransformación y la posible reducción de la bioacumulación (Laue et al., 2014; Nichols et al., 2013).
- Aunque los FBC predichos *in vitro* no sustituyan a los ensayos de bioacumulación en peces, son una alternativa si éstos no son factibles técnicamente, o si el marco regulatorio correspondiente no permite los ensayos en vertebrados.

Guillermo Repetto Universidad Pablo de Olavide

Documento de orientación 286 de la OCDE sobre buenas prácticas in vitro para el desarrollo e implementación de métodos in vitro para el uso regulatorio en la evaluación de la seguridad humana (GIVIMP). 2018

Facilitará la aceptación regulatoria y la adopción internacional de métodos y enfoques alternativos

1. Actualiza con detalle las buenas prácticas para los métodos in vitro (caracterización modelos).
2. Garantiza que los PNT (SOP) estén bien diseñados, sean sólidos, estén bien definidos y descritos y sean aplicables en un entorno de BPL.
3. Describe los aspectos clave que pueden afectar la fiabilidad y relevancia de los datos.
4. Establece los criterios de presentación de resultados, la aplicación de un buen diseño experimental y los criterios de aceptación y estándares de rendimiento



Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

Guía 23 revisada de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática en fase acuosa de productos químicos difíciles (2018, 2000)

- Mejora la validez de los estudios de toxicidad acuática de productos químicos difíciles de ensayar, a la vez que minimiza el número de animales y la necesidad de repetir estudios.
- Particularmente se amplió:
 - Mejora los procedimientos para sustancias de composición variable o desconocida, productos complejos de reacción y materiales biológicos
 - La aplicación sin disolvente de compuestos poco hidrosolubles elimina la necesidad de usar un control de disolvente, y por lo tanto, reduce el número de animales utilizados
- Ahora se pretende determinar si es posible usar solo el control de disolvente en pruebas de toxicidad acuática en peces. Se utilizará una revisión retrospectiva.

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

Revisión de la Guía OCDE 203 de Evaluación de la toxicidad aguda en peces (1992)



Determina CL50 (es una de las pocas guías que aún utilizan la muerte como criterio de valoración).

El proyecto (dirigido por Suiza y el Reino Unido) tiene como objetivo incluir el uso de puntos finales no letales para reducir el sufrimiento.

Borrador en consulta de WNT en 2018

Guillermo Repetto

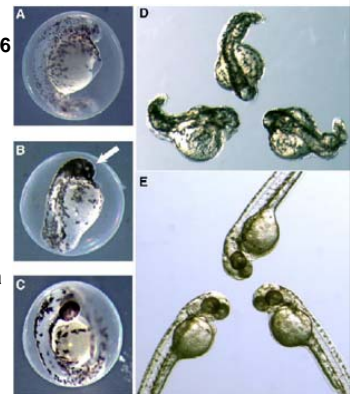
Universidad Pablo de Olavide

Toxicidad aguda en embrión de pez (TG236, 2013)

Huevos fertilizados de pez cebra expuestos 96 h:

- Coagulación del embrión
- Formación del somita
- Caída de la cola
- Latido cardíaco

Buena correlación con la toxicidad aguda en pez



Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

Aproximación del umbral en la toxicidad aguda en pez (TG203, 2010)

- Estrategia secuencial. Supone una reducción del 65.0 al 72.8% del número de peces [ESAC 2006]
- Se pretende incluir en la estrategia al ensayo en embrión de pez

Estrategias para evaluar actividad endocrina

Guía para la identificación de los disruptores endocrinos en el contexto de los reglamentos de la UE sobre biocidas y productos fitosanitarios ((EU) No 528/2012 y (EC) No 1107/2009). 2018

Revisada la Guía 150 de la OCDE sobre Directrices Estandarizadas para la Evaluación de Productos Químicos para la Disrupción Endocrina. 2018 (previa 2012)

+++Directrices

Guillermo Repetto

Test Batteries in Ecotoxicology. Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology Repetto G 2013

(a) *Chlorella vulgaris* bioassay, (b) *Allium cepa* test, (c) *D. magna* bioassay, (d) RTG-2 rainbow trout gonad cell line assay, (e) Vero monkey kidney cell line assay, and (f) *Aliivibrio fischeri* bioluminescence test

Guillermo Repetto Universidad Pablo de Olavide

Aditivo Galato de propilo (100µM)

Ecotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems. Zurita JL, Jos A, del Peso A, Salguero M, López-Artiguez M, Repetto G. Water Research, 41: 2599 – 261. (2007) FI: 2.459

PLHC-1: hepatoma de *Poecilopsis lucida*

RTG-2: fibroblastos de trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*

Conclusiones

- Se ha producido un ingente trabajo de revisión y aprobación de nuevas directrices de ensayo ambientales de la OCDE
- Una parte importante de las nuevas directrices emplean métodos alternativos y refinan los estudios in vivo
- Se han generado 179 documentos de apoyo a las directrices de la OCDE
- Ha habido muchos proyectos internacionales de cooperación
- Se han creado herramientas de apoyo que rentabilizan estudios previos y facilitarán nuevas alternativas
- La CE ha aprobado un método no experimental que sustituye al bioensayo de toxinas en bivalvos
- La integración de ensayos in vitro en estrategias de ensayo puede reducir enormemente el número de animales empleados

Guillermo Repetto

Universidad Pablo de Olavide

ToxEcotox

2019

Desarrollo de métodos alternativos a la Experimentación Animal en Toxicología Ambiental

Guillermo Repetto
Área de Toxicología

Presidente REMA <http://www.remanet.net>
<http://buscaalternativas.com>



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