

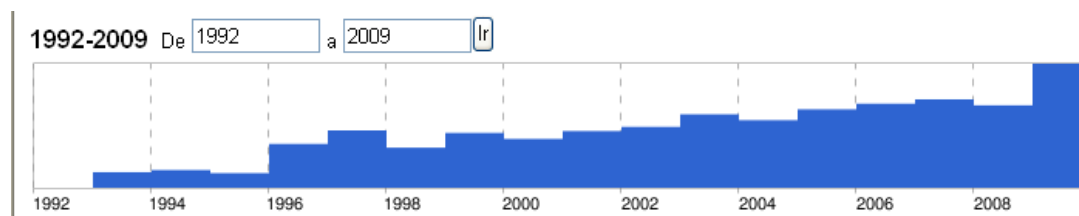


1999-2009 AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

M^a José Gómez-Lechón

Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe
Avda Campanar 21, 46009-Valencia

Durante años, el uso de animales en experimentación científica ha estado sujeto a numerosas controversias, tanto desde un punto de vista ético como científico. Por ello, se ha hecho necesaria una adecuada racionalización de los esfuerzos y recursos disponibles para incorporar poco a poco el uso de los denominados "métodos alternativos" a la experimentación animal como una eficaz herramienta para investigación. Pese a que muchas de las piezas básicas de los modelos y métodos hoy utilizados como alternativos fueran conocidas hace décadas, no es hasta la década de los ochenta cuando cristaliza de manera tangible el interés científico y social en favor de los ensayos alternativos. Casi treinta años después, lo que en su momento pudo ser considerado como moda pasajera tiene ya carta de naturaleza. Hay que destacar que a ello ha contribuido significativamente el firme propósito mostrado en la última década por la Comisión Europea de reforzar la legislación que regula actualmente los experimentos con animales en la Unión Europea. Con este fin ha llevado a cabo un amplio período de consultas para actualizar la normativa principal en esta área (la Directiva 86/609/CEE), que protege a los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), que forma parte del Centro Común de Investigación de la Comisión Europea, se creó en 1991 en respuesta a dicha Directiva para la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Esa Directiva exige a los Estados miembros y a la Comisión que apoyen activamente el desarrollo, validación y aceptación de métodos que puedan reducir, mejorar o sustituir la utilización de animales de laboratorio. Establece, asimismo, que «no deberá realizarse un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio, razonable y factible para obtener el resultado perseguido, y que no implique la utilización de un animal». Como muestra el siguiente gráfico el desarrollo y publicación de métodos alternativos, particularmente de reemplazo, al uso de animales de experimentación casi inexistentes en los años anteriores sufre un significativo incremento a partir de 1992 (<http://www.google.es/archivesearch/intl/es/help.html>).



En este contexto, conviene destacar la contribución de la Comisión para fomentar la investigación y la competitividad de la Unión Europea en esta área tan urgente, ayudando a canalizar recursos hacia programas e instituciones de investigación que desarrollen alternativas a los experimentos con animales. Se puede consultar un listado detallado de los proyectos financiados por la Unión Europea dentro de los diferentes REMA. Red Española para el desarrollo de Métodos Alternativos a la experimentación animal. www.remanet.net
Tf:918223540. fax: 915097029 e-mail: remanet@remanet.es

programas marco en la última década cuyo objetivo es desarrollar modelos y estrategias in vitro para la evaluación de la seguridad de fármacos, cosméticos y productos químicos (http://cordis.europa.eu/home_es.html, <http://www.ivtip.org/research>). Sin duda ello ha promovido de forma muy notoria el desarrollo de nuevos métodos experimentales alternativos a la experimentación animal para investigación en los ámbitos científicos y biomédicos disciplinas tradicionalmente usuarias de un gran número de animales. Entre las áreas de mayor interés en la aplicación de procedimientos alternativos se incluyen: toxicología, farmacología, cosmética, fisiología, bioquímica, biología celular y molecular, genética, investigación de productos e instrumentos de medicina, odontología, veterinaria y producción y control en calidad en medicina (<http://buscaalternativas.com/>; [Http://www.rediris.es/list/info/3erres.html](http://www.rediris.es/list/info/3erres.html); <http://caat.jhsph.edu/> <http://www.frame.org.uk/>; <http://www.lal.org.uk/pdf.htm>; [file:///d:/reddatos/toxweb2/aet/gtema](file:///d:/reddatos/toxweb2/aet/gtema;); <http://www.frame.org.uk/3rs/3rsintro.htm> <http://altweb.jhsph.edu/>; <http://www.bfr.bund.de/cd/1508>).

Asimismo, hay que destacar la cada vez mayor convergencia del interés común por lograr un menor y más racional uso de los animales de experimentación por parte de la Industria, Academia, Administración y Sociedades de protección de animales. Ello se ha plasmado en España en la creación en 1999 de la Red Española de Metodos Alternativos a la Experimentación Animal (REMA) integrando y coordinando las iniciativas de la Industria, la Administración y la Sociedad con las del Mundo Científico respecto a la aplicación e implementación del principio de las 3Rs. De manera casi paralela se ha establecido en Europa una plataforma de plataformas nacionales- ECOPA (European Consensus platform for Alternatives, <http://ecopa.vub.ac.be>) -en la que REMA participa como miembro fundador y a la que aún se están adhiriendo los diferentes países europeos. La creación de estas plataformas ha contribuido de forma decisiva en fomentar la investigación para el desarrollo de los métodos alternativos.

Un logro muy importante en el reconocimiento de los modelos alternativos a nivel nacional fue el consenso alcanzado en 2005 por parte de las sociedades científicas, las protectoras de animales, la industria farmacéutica y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, para la elaboración del Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos fundamentalmente investigación. El Ministerio de la Presidencia español publicó el Real Decreto como adaptación a la legislación europea (Directiva 86/609/CE, 2003/65/CE y Convenio Europeo de Protección de los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos). El real Decreto regula específicamente la experimentación animal y hay un control sobre ello desde el Ministerio competente y las comunidades autónomas. Como punto más interesante debe destacarse la exigencia de que la experimentación sea supervisada por el comité ético de cada centro y la creación de una Comisión Ética Estatal de Bienestar Animal. La finalidad es asegurar la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. En particular, que se les conceda a los animales utilizados cuidados adecuados, que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o lesión prolongados; que se evite toda duplicación inútil de procedimientos, y que el número de animales utilizados en los procedimientos se reduzca al mínimo, aplicando en lo posible métodos alternativos.

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

17344 REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

La Directiva 86/609/CEE del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, tiene como objeto armonizar la legislación de los distintos Estados miembros de la Unión Europea en lo que se

los animales de laboratorio y sobre adquisición y transporte de estos.

La existencia de diferentes órganos para la valoración de la oportunidad de las prácticas de investigación revela la conveniencia de regularlos como instrumento para lograr los fines enunciados en la mencionada directiva.

La creciente preocupación de la sociedad por la protección de los animales y la calidad de la investigación, en la que la observación, el control, el bienestar, el mantenimiento y el cuidado de los animales que se utilizan en experimentación es un pilar básico, así como los cambios en la legislación y los continuos avances científicos, hacen necesaria la actualización de la normativa vigente.

El artículo 36.2 de la Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal, señala que las condiciones sanitarias básicas que deben cumplir las explotaciones de ani-

El acuerdo de cooperación más reciente a nivel mundial se firmó el 27 de abril de 2009 por cuatro organizaciones internacionales para acelerar las alternativas a los experimentos con animales e impulsar a los esfuerzos internacionales para reducir la cantidad de animales utilizados en investigación. Los firmantes son el «Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos» (ECVAM), que forma parte del Centro Común de Investigación de la Comisión Europea, el «Programa Nacional de Toxicología» (NTP) de los Estados Unidos, el «Centro Interdepartamental para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos» (NICEATM), la «Oficina Canadiense de Ciencias de la Salud e Investigación» y el «Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos» (JaCVAM). Estas organizaciones ya colaboraban estrechamente, pero este nuevo acuerdo tiene como objetivo formalizar y fortalecer sus actividades conjuntas. Los firmantes confían en que, gracias a esta colaboración, serán capaces de acelerar el desarrollo y la validación de métodos de prueba alternativos que reduzcan la cantidad de animales utilizados en la investigación. Al colaborar de forma más estrecha, las organizaciones también esperan acelerar la aceptación de nuevos métodos por parte de los organismos reguladores, tanto en los países y regiones involucrados en el acuerdo como en los demás.

Aunque coloquialmente suelen identificarse los métodos alternativos con las técnicas *in vitro*, no son términos sinónimos. Lamentablemente, el reemplazo no es siempre una de las opciones existentes. Aún existen enormes lagunas en nuestros conocimientos de biología que limitan la utilidad de métodos alternativos de forma amplia. Ningún ordenador actual, modelo celular o ensayo biológico pueden simular enteramente, por ejemplo el mecanismo de funcionamiento del cerebro, por no hablar de las interacciones con el corazón, el hígado y los riñones. Todos los que trabajan en el campo de la investigación médica desean ver llegar el día en que tal descubrimiento nos permita prescindir de la investigación con animales. Pero hasta entonces, si la sociedad quiere que se produzcan tratamientos y curas para enfermedades existentes y por descubrir, seguirá siendo necesario un pequeño porcentaje de experimentación adecuadamente controlada con animales. De hecho algunos tipos de pruebas no pueden llevarse a cabo sin el empleo de animales, al menos en la actualidad. En estos casos, los investigadores se esfuerzan por reducir el número de animales usados en cada experimento. Mediante un diseño experimental cuidadoso y el empleo de modelos estadísticos sofisticados, los

REMA. Red Española para el desarrollo de Métodos Alternativos a la experimentación animal. www.remanet.net
Tf:918223540. fax: 915097029 e-mail: remanet@remanet.es

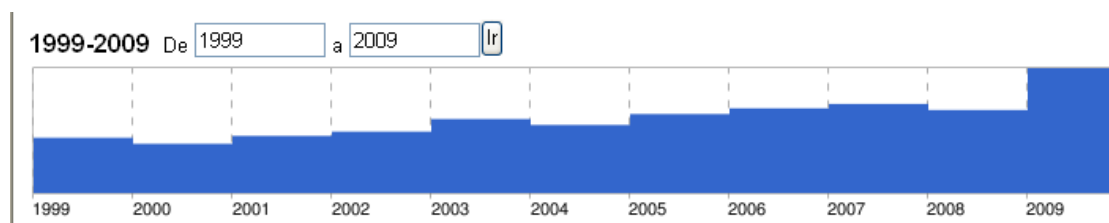
investigadores pueden realizar un estudio más completo de los datos obtenidos de cada animal usado, además de utilizar menor número de animales mientras los resultados son igualmente válidos. Otro tipo de alternativa por reducción consiste en compartir los animales de experimentación con otros investigadores para otros proyectos. Los estudios se pueden diseñar de modo que permitan la recolección del mayor número posible de información del mismo grupo de animales para así reducir el número total de animales usados. Los logros de la reducción de animales para investigación se pueden resumir en los siguientes puntos: 1) reducir al mínimo el número de animales utilizados, 2) optimizar los recursos en el diseño experimental evitando la repetición innecesaria de experimentos, 2) mantener la validez estadística y apropiada a la investigación y 3) optimizar los cuidados de los sujetos experimentales.

No hay que olvidar, los avances en las alternativas por refinamiento que incluyen cualquier cambio que permita la reducción del dolor o el estrés a que se somete a los animales, o que mejoren su bienestar y el empleo de técnicas que son menos invasivas para el animal (<http://buscaalternativas.com/>).

Los avances más recientes de la biotecnología han permitido desarrollar numerosos métodos que intentan sustituir la experimentación con animales. Se trata de reemplazar a los vertebrados por cualquier otro método que emplee material no sensitivo. Entendiendo por material no sensitivo aquel cuya capacidad para sentir dolor está reducida al máximo, debido en unos casos a la carencia de sistema nervioso y en otros, al menor desarrollo de sus sistemas sensoriales. Posiblemente sea la reunión científica que tuvo lugar en Soesterberg (Holanda) en 1980, (International Workshop on the application of Tissue Culture in Toxicology, primera de la serie de INVITOX), la primera de una larga serie de eventos y reuniones de científicos, donde se comenzó a considerar que los modelos celulares podían ser una valiosa herramienta para una mejor comprensión de fenómenos hasta entonces sólo investigados en el animal de laboratorio. En este sentido, existen hoy día una variedad de técnicas de experimentación sin el empleo de animales, que además de constituir un elemento más ético en práctica científica, pueden ser más económicas y efectivas: el cultivo de células, tejidos y órganos; el uso de especies inferiores en la escala filogenética tales como las bacterias, la investigación molecular; los estudios con tejidos post-mortem; los modelos matemáticos o de simulación (ej. QSAR), los estudios epidemiológicos de población e investigación clínica con voluntarios humanos que estén informados y den su libre consentimiento a las pruebas. Actualmente, los modelos in vitro en investigación básica son los modelos utilizados de manera rutinaria. La mayor parte de la investigación biomédica en sus aspectos más mecanicistas, se realiza también sobre modelos celulares. En ocasiones se emplea material procedente directamente de animales o humanos, y otras veces se emplean células que se han adaptado a crecer indefinidamente in vitro. Son enormes las ventajas de la utilización de modelos in vitro para investigación: 1) utilización de material biológico muy homogéneo obtenido con técnicas estandarizadas, 2) posibilidad de utilizar material de origen humano, lo que puede simplificar la extrapolación, 3) posibilidad de estudiar mecanismos de acción de una determinada población celular aislada, sin interferencias por otros órganos, células u orgánulos, 4) mayor facilidad para objetivar y cuantificar los resultados que los ensayos in vivo, 5) mayor reproducibilidad de los resultados que los de los métodos con

animales, 6) mayor precisión control en el diseño experimental, 7) generalmente menor coste económico y 8) necesidad de instalaciones menos complejas.

Es muy llamativo el elevado número de modelos alternativos in vitro (alrededor de 700) que se reseñan en Internet solo durante la última década, como muestra el gráfico inferior (<http://www.google.es/archivesearch/intl/es/help.html>).



No hay que olvidar que por su propia naturaleza los modelos in vitro son una simplificación de una realidad mucho más compleja que es el ser vivo, y por ello la información que son capaces de proporcionar es en ocasiones parcial. Los recientes avances de los últimos años en el desarrollo de modelos experimentales in vitro (co-cultivos, micromasas, cultivos organotípicos, células madre, células manipuladas genéticamente, etc), la ingeniería tisular y la tecnología básica en cribado (HTS) abren nuevas y prometedoras perspectivas para la investigación utilizando modelos de reemplazo mucho más complejos, capaces de dar respuestas más representativas de las que se obtienen in vivo. Sin ninguna duda la investigación con células madre constituye uno de los grandes avances de los últimos años, abriendo insospechadas posibilidades en la producción de nuevos modelos celulares sofisticados para investigación. Por otra, la utilización de baterías de ensayos en lugar de ensayos o tests individuales y la utilización de ensayos multiparamétricos, que permiten medir simultáneamente un gran número de biomarcadores en la misma población celular, han abierto nuevas posibilidades en la investigación con modelos in vitro.

Hay muchas potenciales aplicaciones de las células madre humanas para la investigación básica y clínica. Sin embargo, todavía hay muchas cuestiones técnicas complejas para concretar estas aplicaciones de células madre, que serán superadas solamente con investigaciones intensas y continuas. Todavía hoy una meta fundamental es identificar cómo se diferencian las células madre indiferenciadas. Las células madre humanas podrían ser utilizadas para probar nuevas drogas. Por ejemplo, las nuevas medicaciones para la cura de enfermedades podrían ser probadas en las líneas de células madre humanas pluripotentes para obtener una mayor eficacia. Otras clases de células se utilizan ya para estos fines. Las líneas celulares de cáncer se utilizan, por ejemplo, para probar potenciales drogas antitumorales. Pero, la disponibilidad de células madre pluripotentes permitiría la prueba de drogas en una gama más amplia de variedades celulares.

Un avance en la estrategia para los estudios fundamentalmente en el campo de la biomedicina, evaluación de la seguridad de fármacos, productos químicos, cosméticos etc. ha sido el análisis de los resultados obtenidos a partir de la combinación de baterías bien de diferentes ensayos en un mismo tipo de células, o bien de uno o varios ensayos en diferentes tipos de células de forma que se obtiene información complementaria. La utilización de baterías de tests celulares ha mostrado ser una

estrategia mucho más efectiva que los tests individuales. El poder predictivo de estas baterías se incrementa con la ayuda de los adecuados análisis bioinformáticos. Por ejemplo, la precisión de la batería MEIC alcanzó un asombroso 83% de exactitud en la predicción de toxicidad aguda humana real, comparado con el 65% de precisión de los tests animales (<http://www.cctoxconsulting.a.se/meic.htm>).

La utilización de las nuevas metodologías ómicas (genómica, proteómica, metabolómica y citómica) junto con las aportaciones de los métodos *in vitro* e *in silico*, constituye una estrategia multidisciplinar de una utilidad sin precedentes. Todo ello unido a además a la tecnología de cribado de alto rendimiento (*high throughput assays*), por ejemplo para el desarrollo de herramientas terapéuticas, posee un potencial de futuro todavía por explorar. El desarrollo de arrays de ADN ha permitido estudios de alto rendimiento cuantificando los niveles de RNA mensajero de diversos sistemas biológicos. El hecho de que el papel funcional de los mismos sea desempeñado por proteínas, unido a la falta de correlación exhaustiva entre los niveles de transcritos y proteínas han llevado al desarrollo de tecnologías de alto rendimiento para la determinación multiparamétrica de proteínas también. El aumento de técnicas de proteómica ha sido además favorecido por la relevancia biológica asociada a un mejor conocimiento en los niveles de expresión proteicos y sus modificaciones post-transcripcionales, y el hecho de que las proteínas representan también la mayor parte de dianas terapéuticas para ser desarrolladas farmacológicamente. Las más recientes ómicas (citómica y metabolómica) se encargan de relacionar el proteoma con la estructura y función celulares. La multitud de proteínas que constituyen el proteoma participan en complejas vías de transducción de señales que controlan el metabolismo del organismo y los tejidos, y consecuentemente influyendo en la síntesis y degradación de pequeñas moléculas. La metabolómica puede definirse como la ciencia ómica más emergente, que permite obtener un perfil metabólico de una muestra biológica compleja, a través de la combinación de técnicas analíticas que generan gran cantidad de datos y del análisis estadístico multivariante de ellos. Finalmente, la citómica se define como la ciencia de análisis celular que integra los conocimientos de la genómica y la proteómica con la función dinámica de los sistemas celulares complejos, es decir de los citomas mediante el análisis de células individuales.

Finalmente, la nanotecnología todavía hoy una disciplina emergente, pero con muchas líneas de investigación y desarrollo abiertas con grandes posibles aplicaciones futuras en el campo de la medicina y salud, para reducir los experimentos con animales mientras se mantiene la seguridad para los pacientes y los consumidores. Entre sus posibles aplicaciones destacan la creación de nuevos productos médicos que faciliten la administración de fármacos *in situ*, el screening de nuevas drogas, los métodos diagnósticos, el seguimiento de los pacientes y las intervenciones quirúrgicas mínimamente invasivas. Conceptos más futuristas incluyen el desarrollo de dispositivos integrados capaces de alcanzar específicamente células alteradas (por ej. células tumorales), detectar defectos en el RNA, DNA o proteínas, seleccionar una droga apropiada en base a estas características, inducir un tratamiento no invasivo, documentar la respuesta al tratamiento e identificar células enfermas residuales.

Algunos de los avances más llamativos en los últimos años se han dado en las áreas de corrosividad ocular y cutánea, fototoxicidad y producción de anticuerpos monoclonales. Otros avances menos conocidos, pero también muy importantes, han ocurrido en la

valoración de productos biológicos, en metodologías de educación médica y veterinaria y en el manejo y mantenimiento de animales para fines experimentales. Quizás, uno de los mas importantes logros, y desde luego un punto de inflexión en la historia de las 3Rs y los ensayos con animales, fue la supresión en Diciembre de 2002 de la prueba de estimación de la Dosis Letal 50 (DL50) de todas las normativas gubernamentales internacionales de ensayos sobre productos químicos por la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development).

Podemos concluir que el gran reto para los investigadores en el futuro debería ser la supresión de todos los experimentos con animales. Si existe la posibilidad de una alternativa científicamente sólida a los experimentos con animales, deberíamos desarrollarla y utilizarla. ECVAM ya ha validado muchas, y la ciencia ofrece la posibilidad de crear muchas más. Los avances que en los próximos años se produzcan en los campos de la biotecnología, biología celular y molecular serán decisivos para alcanzar este reto.

Para consultar más ejemplos de métodos alternativos, se puede consultar el sitio en internet del Fondo para el Reemplazo de Animales en Experimentación Médica (Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments, FRAME), <http://www.frame.org.uk/3rs/3rsintro.htm>, y el de la Sociedad Humana de los Estados Unidos (Humane Society of the United States, HSUS), <http://www.hsus.org/ace/11388>. También hay información relevante en el capítulo sobre "Metodologías Alternativas" del libro publicado por el Centro de Información sobre Bienestar Animal (Animal Welfare Information Center, AWIC) y titulado "Lo Esencial para la Investigación Animal: Modelo para Personal Investigador" (Essentials for Animal Research: A Primer for Research Personnel). Este documento se puede encontrar en: <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/essentia.htm#2>.