

PARTE B: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD Y OTROS EFECTOS SOBRE LA SALUD

INTRODUCCIÓN GENERAL DE LA PARTE B

A. NOTA EXPLICATIVA

Para los fines de la presente introducción, se aplicará la siguiente numeración:

B.15 Mutación génica en *Saccharomyces cerevisiae*

B.16 Recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*

B.17 Mutación génica de células de mamífero in vitro

B.18 Lesión y reparación de ADN: síntesis de ADN no programada en células de mamífero in vitro

B.19 Ensayo in vitro de intercambio de cromátidas hermanas

B.20 Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila melanogaster*

B.21 Ensayo de transformación de células de mamífero in vitro

B.22 Ensayo de letalidad dominante en roedores

B.23. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOGONIAS DE MAMÍFERO

B.24 Ensayo de la mancha en ratón

B.25 Translocación hereditaria en ratón

B.26 Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en roedores

B.27 Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en no roedores

B.28 Toxicidad dérmica subcrónica: ensayo de 90 días en roedores

B.29 Toxicidad subcrónica por inhalación: ensayo de 90 días en roedores

B.30 Ensayo de toxicidad crónica

B.31 Estudio de teratogenicidad: roedores y no roedores

B.32 Ensayo de carcinogénesis

B.33 Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis

B.34 Ensayo de toxicidad para la reproducción en una generación

B.35 Ensayo de toxicidad para la reproducción en dos generaciones

B.36 Toxicocinética

B. DEFINICIONES GENERALES DE LOS TÉRMINOS UTILIZADOS EN LOS MÉTODOS DE ENSAYO DEL PRESENTE ANEXO

(i) Toxicidad aguda incluye los efectos nocivos que se manifiestan durante un período dado (habitualmente 14 días), después de la administración de una dosis única de una sustancia.

(ii) Toxicidad evidente es un término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de una sustancia. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del riesgo y deben ser tales que, ante un aumento de la dosis administrada, prueba esperarse la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.

(iii) Dosis es la cantidad de sustancia administrada. La dosis se expresa en peso (gramos o miligramos) o en peso de sustancia por unidad de peso del animal (por ejemplo, miligramos por kilogramo de peso corporal), o en concentración alimentaria constante (partes por millón o miligramos por kilogramo de alimento).

(iv) Dosis discriminante es la dosis más elevada de las cuatro establecidas que se puede administrar sin que se produzca mortalidad debida a la sustancia (incluyendo el sacrificio por motivos compasivos).

(v) Dosificación es un término general que incluye la dosis y la frecuencia y duración de su administración.

(vi) DL50 (dosis letal media) es la dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado. El valor de la DL50 se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (miligramos por kilogramo).

(vii) CL50 (concentración letal media) es la concentración, obtenida por estadística, de una

sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50 % de los animales expuestos a dicha sustancia durante un período determinado.

El valor de la CL50 se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro).

(viii) NOAEL son las siglas inglesas de nivel sin efectos adversos observados, que es la dosis o nivel de exposición máximo sin que se observe ningún signo adverso relacionado con el tratamiento.

(ix) Toxicidad subcrónica (por administración continuada) incluye los efectos adversos que aparecen en los animales de laboratorio cuando reciben repetidamente dosis diarias de una sustancia o cuando están expuestos diariamente a la misma durante un período de tiempo breve, en comparación con su expectativa de vida.

(x) Dosis máxima tolerada (DMT) es el nivel más alto de dosis que produce signos de toxicidad en los animales sin alterar de forma importante la supervivencia en relación con la prueba en la que se usa.

(xi) Irritación cutánea es la producción de modificaciones inflamatorias de la piel que aparecen después de la aplicación de la sustancia.

(xii) Irritación ocular es la producción de modificaciones inflamatorias del ojo que aparecen después de la aplicación de la sustancia sobre la superficie anterior del ojo.

(xiii) Sensibilización de la piel (dermatitis alérgica de contacto) es una reacción cutánea, de origen inmunológico, a una sustancia.

(xiv) Corrosión dérmica es la producción de lesiones tisulares irreversibles en la piel que aparecen después de la aplicación de la sustancia durante un período de 3 minutos a 4 horas.

(xv) Toxicocinética es el estudio de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de las sustancias de prueba.

(xvi) Absorción es el proceso o procesos por los que penetra en el organismo una sustancia administrada.

(xvii) Excreción es el proceso o procesos por los que se eliminan del organismo la sustancia administrada y sus metabolitos.

(xviii) Distribución es el proceso o procesos por los que la sustancia absorbida y sus metabolitos se reparten por el interior del organismo.

(xix) Metabolismo es el proceso o procesos por los que la sustancia administrada se modifica estructuralmente en el organismo por medio de reacciones tanto enzimáticas como de otro tipo.

B.I Toxicidad aguda, subcrónica (por administración continuada) y crónica

Los efectos tóxicos agudos y la toxicidad orgánica o sistémica de una sustancia pueden evaluarse mediante diversos ensayos de toxicidad (métodos B.1-B.5) a partir de los cuales, tras una dosis única, puede obtenerse una indicación previa de la toxicidad.

En función de la toxicidad de la sustancia, puede considerarse la realización de una prueba límite o la determinación completa de la DL50, aunque en los estudios de inhalación no se especifica ninguna prueba límite, ya que no ha sido posible definir un solo valor límite de exposición por inhalación.

Debe prestarse atención a los métodos que utilizan el mínimo posible de animales y reducen su sufrimiento como, por ejemplo, los métodos de dosis fija (método B.1 bis) y de clase tóxica aguda (método B.1 ter). En las pruebas de nivel 1, un estudio realizado con una segunda especie puede complementar las conclusiones deducidas del primer estudio. En este caso, puede utilizarse un método de referencia o bien puede adaptarse el método a un número menor de animales.

El ensayo de toxicidad por administración continuada (métodos B.7, B.8 y B.9) incluye la evaluación de los efectos tóxicos derivados de la exposición repetida. Se insiste en la necesidad de realizar observaciones clínicas cuidadosas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. Estos ensayos deben contribuir a identificar los órganos diana de la

toxicidad, así como las dosis tóxicas y las no tóxicas. Puede ser necesario realizar investigación complementaria en profundidad sobre estos aspectos mediante estudios a largo plazo (métodos B.26 a B.30 y B.33).

B.II Mutagenicidad y genotoxicidad

La mutagenicidad se refiere a la inducción de cambios transmisibles y permanentes en la cantidad o en la estructura del material genético de las células u organismos. Estos cambios, o mutaciones, pueden afectar a un solo gen o segmento génico, a un bloque de genes o a cromosomas completos. Los efectos sobre los cromosomas completos pueden ser estructurales o numéricos.

La actividad mutagénica de una sustancia, para la información de base, se evalúa mediante ensayos *in vitro* para detectar mutaciones génicas (puntuales) en bacterias (método B.13/14) o aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero (método B.10).

También son aceptables los métodos *in vivo* como, por ejemplo, el ensayo de micronúcleos (método B.12) o el análisis de la metafase de células de médula ósea (método B.11). No obstante, si no hay ninguna contraindicación, se prefieren claramente los métodos *in vitro*.

Para volúmenes de producción más elevados, o para hacer o seguir una evaluación del riesgo, pueden ser necesarios estudios adicionales a fin de investigar más sobre la mutagenicidad o establecer un cribado previo de la carcinogenicidad; estos estudios pueden utilizarse con diversos fines: confirmar resultados obtenidos en las pruebas básicas, investigar parámetros no estudiados en dichas pruebas básicas, o bien iniciar o ampliar estudios *in vivo*.

Para estos fines, los métodos B.15 a B.25 incluyen sistemas eucarióticos tanto *in vivo* como *in vitro* y una gama ampliada de parámetros biológicos. Estas pruebas proporcionan información sobre mutaciones puntuales y otros parámetros en organismos más complejos que las bacterias utilizadas en el conjunto básico.

Como principio general, cuando se considere un programa de estudios complementarios de mutagenicidad, éste deberá elaborarse de forma que proporcione información adicional pertinente sobre el potencial mutagénico o carcinogénico de la sustancia estudiada.

Los estudios concretos más adecuados para un caso específico dependen de muchos factores, como las características químicas y físicas de la sustancia, los resultados de los ensayos iniciales bacterianos y citogenéticos, el perfil metabólico de la sustancia, los resultados de otros estudios de toxicidad y los usos conocidos de la sustancia. En consecuencia, no es apropiado aplicar un esquema rígido para la selección de los ensayos, dada la variedad de factores que puede ser necesario considerar.

En la Directiva 93/67/CEE se establecen algunos principios generales sobre la selección de los ensayos, y en el documento de orientación técnica sobre evaluación del riesgo pueden encontrarse enfoques claros sobre los ensayos, aunque de todas formas es flexible y puede adaptarse según convenga a las circunstancias específicas.

No obstante, a continuación se agrupan los métodos de investigación complementaria, según su principal parámetro genético:

Estudios para investigar mutaciones génicas (puntuales)

- a) Estudios sobre mutaciones directas o revertidas en microorganismos eucarióticos (*Saccharomyces cerevisiae*) (método B.15)
- b) Estudios *in vitro* para investigar mutaciones directas en células de mamífero (Método B.17)
- c) Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila melanogaster*, (Método B.20)
- d) Ensayo de mutaciones en células somáticas *in vivo*, prueba de la mancha en ratón (Método B.24).

Estudios para investigar aberraciones cromosómicas

- a) Estudios citogenéticos *in vivo* en mamíferos; el análisis *in vivo* de las células en metafase de médula ósea debe considerarse si no se había incluido en la evaluación inicial (método B.11). Además, puede investigarse la citogenética de las células germinativas *in vivo* (método B.23)
- b) Estudios citogenéticos *in vitro* en células de mamíferos, si no se habían incluido en la

evaluación inicial (método B.10)

c) Estudios de letalidad dominante en roedores (método B.22)

d) Ensayo de translocación hereditaria en ratón (método B.25).

Efectos genotóxicos: efectos sobre el ADN

Las lesiones inducidas en el ADN sin pruebas directas de mutación pueden indicar genotoxicidad (efectos potencialmente nocivos sobre el material genético no asociados necesariamente con mutagenicidad). Para esta investigación pueden ser apropiados los siguientes métodos con microorganismos eucarióticos o células de mamífero:

a) Recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae* (método B.16)

b) Lesión y reparación del ADN: síntesis de ADN no programada en células de mamífero in vitro (método B.18)

c) Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero in vitro (método B.19).

Métodos alternativos para investigar la capacidad carcinogénica

Hay ensayos de transformación de células de mamífero in vivo que miden la capacidad de una sustancia para inducir cambios morfológicos y de comportamiento en los cultivos celulares, cambios que se consideran asociados con la transformación maligna (método B.21). Pueden utilizarse distintos tipos de células y diversos criterios de transformación.

Evaluación del riesgo de efectos hereditarios en mamíferos

Se dispone de métodos que pueden medir los efectos hereditarios en mamíferos completos producidos por mutaciones génicas (puntuales) como, por ejemplo, la prueba del locus específico del ratón, para medir la mutación de células germinales en la primera generación (no incluida en el presente Anexo), o las aberraciones cromosómicas como, por ejemplo, la prueba de translocación hereditaria en ratón (método B.25). Tales métodos pueden utilizarse cuando se evalúe el posible riesgo genético de una sustancia para el hombre. No obstante, dada la complejidad de estos ensayos y el elevadísimo número de animales necesarios, sobre todo para la prueba del locus específico, es necesario tener una sólida justificación antes de emprender dichos estudios.

B.III Carcinogenicidad

Los productos carcinógenos pueden clasificarse como genotóxicos o no genotóxicos, según el mecanismo supuesto de acción.

A partir de los resultados de los estudios sobre mutagenicidad y genotoxicidad se puede obtener una información previa del potencial carcinogénico genotóxico. Puede obtenerse información complementaria a partir de los ensayos de toxicidad por administración continuada (subcrónica) o crónica. La prueba de toxicidad por administración continuada (método B.7) y los estudios de administración continuada durante más tiempo incluyen la evaluación de los cambios histopatológicos observados en los ensayos de toxicidad por administración continuada como, por ejemplo, la hiperplasia en ciertos tejidos de posible importancia. Estos estudios y la información sobre toxicocinética pueden ayudar a detectar los productos químicos que presenten potencial carcinogénico, y que pueden requerir más estudios en profundidad sobre este aspecto, en un ensayo de carcinogénesis (método B.32) o, frecuentemente, en un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (método B.33).

B.IV Toxicidad para la reproducción

La toxicidad para la reproducción puede detectarse de formas diferentes como, por ejemplo, alteraciones de las funciones o capacidades reproductoras masculina y femenina (efectos sobre la fertilidad), o inducción de efectos nocivos no hereditarios sobre la progenie (toxicidad para el desarrollo), entre los que se incluyen también la teratogenicidad y los efectos durante la lactancia.

Respecto a los estudios de teratogenicidad, como parte de los ensayos de toxicidad para el desarrollo, el método de ensayo B.31 se centra principalmente en la administración por vía oral. De forma alternativa pueden utilizarse otras vías, en función de las propiedades físicas de la sustancia estudiada o de la vía probable de exposición de los seres humanos. En tales casos, el

método de ensayo debe adaptarse de forma adecuada, teniendo en cuenta los elementos pertinentes de los métodos de ensayo de 28 días.

Cuando sea necesario realizar un ensayo de reproducción (fertilidad) en tres generaciones, podrá ampliarse el método descrito para el ensayo de reproducción en dos generaciones (método B.35) para incluir una tercera generación.

B.V Neurotoxicidad

La neurotoxicidad puede detectarse de formas diferentes como, por ejemplo, cambios funcionales o cambios estructurales y bioquímicos en los sistemas nerviosos central o periférico. A partir de los ensayos de toxicidad aguda puede obtenerse una indicación preliminar de la presencia de neurotoxicidad. El ensayo de toxicidad por administración continuada (método B.7) incluye la evaluación de los efectos neurotoxicológicos, y se subraya la necesidad de realizar cuidadosamente observaciones clínicas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método debe ayudar a detectar los productos químicos que presenten potencial neurotóxico y que pueden requerir investigación complementaria en profundidad sobre este aspecto. Además, es importante considerar el potencial de las sustancias para producir efectos neurotóxicos específicos que pueden no detectarse en otros estudios de toxicidad. Por ejemplo, se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada y pueden evaluarse con los métodos B.37 y B.38, tras exposición única o bien tras administración continuada.

B.VI Inmunotoxicidad

La inmunotoxicidad puede detectarse de formas diferentes como, por ejemplo, inmunosupresión o aumento de la capacidad de respuesta del sistema inmunitario que produce hipersensibilidad o autoinmunidad inducida. El ensayo de toxicidad por administración continuada (método B.7) incluye la evaluación de los efectos inmunotóxicos. El método debe ayudar a detectar los productos químicos que presenten potencial inmunotóxico, y que pueden requerir investigación adicional en profundidad sobre este aspecto.

B.VII Toxicocinética

Los estudios de toxicocinética ayudan a interpretar y evaluar los datos de toxicidad. Estos estudios van encaminados a aclarar aspectos determinados de la toxicidad de la sustancia química objeto de estudio, y sus resultados pueden ayudar a idear estudios de toxicidad ulteriores. No se contempla la necesidad de determinar en cada caso todos los parámetros. Sólo en casos esporádicos será preciso realizar toda la secuencia de estudios de toxicocinética (absorción, excreción, distribución y metabolismo). En el caso de determinados compuestos, tal vez sea oportuno hacer cambios en esta secuencia, o baste un estudio de dosis única (método B.36).

La información sobre la estructura química y las propiedades fisicoquímicas pueden dar también una idea de las características de absorción por la vía prevista de administración y las posibilidades de metabolización y distribución tisular. También puede haber información sobre parámetros toxicocinéticos procedente de estudios anteriores de toxicidad y toxicocinética.

C. CARACTERIZACIÓN DE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Antes de iniciar cualquier estudio de toxicidad debe conocerse la composición de la sustancia de ensayo, con inclusión de las impurezas principales, y sus propiedades fisicoquímicas pertinentes, incluida la estabilidad.

Las propiedades fisicoquímicas de la sustancia de ensayo proporcionan datos importantes para la selección de la vía de administración, el diseño de cada estudio particular y el manejo y almacenamiento de la sustancia.

Antes de iniciarse el estudio debe, desarrollarse un método analítico para la determinación cualitativa y cuantitativa de la sustancia de ensayo (con inclusión de sus principales impurezas, siempre que sea posible) en el medio de administración y en el material biológico.

Debe incluirse en el informe del ensayo toda la información a la identificación, propiedades fisicoquímicas, pureza y comportamiento de la sustancia estudiada.

D. CUIDADOS DE LOS ANIMALES

En los estudios de toxicidad es fundamental controlar de forma estricta las condiciones ambientales y aplicar técnicas adecuadas de cuidado de los animales.

(i) Condiciones de alojamiento

Las condiciones ambientales de los locales o recintos destinados a los animales de experimentación deben ser adecuadas para la especie que se utilice. Para ratas, ratones y cobayas, la temperatura del local debe ser de 22 ± 3 °C, con una humedad relativa del 30 al 70 %; para los conejos, la temperatura debe ser de 20 ± 3 °C, con una humedad relativa del 30 al 70 %. Algunas técnicas experimentales son particularmente sensibles a los efectos de la temperatura; en tales casos, en la descripción del método de ensayo se incluyen indicaciones detalladas sobre las condiciones apropiadas. En todas las investigaciones sobre efectos tóxicos deben medirse y registrarse la temperatura y la humedad, y estos parámetros deben consignarse en el informe final del estudio.

La iluminación debe ser artificial, con una alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los datos relativos al programa de alumbrado deberán registrarse y consignarse en el informe final del estudio.

Salvo que el método contenga alguna indicación en contra, los animales se alojarán individualmente, o estarán en jaulas de pequeños grupos del mismo sexo. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de 5 animales en cada jaula.

En los informes sobre los experimentos con animales, es importante indicar el tipo de jaula utilizada, así como el número de animales alojados en cada una, tanto durante la exposición a la sustancia química como durante el período posterior de observación.

(ii) Condiciones de alimentación

La dieta debe cubrir todas las necesidades nutricionales de la especie sometida a experimentación. Cuando se incorporen sustancias de ensayo a la dieta de los animales, el valor nutricional puede verse reducido por interacciones entre las sustancias y algún componente de la dieta. A la hora de interpretar los resultados de los ensayos debe estudiarse la posibilidad de que se dé una interacción de este tipo. Pueden utilizarse dietas convencionales de laboratorio junto con un aporte ilimitado de agua potable. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia estudiada si se administra por este método.

Ningún contaminante de la dieta con influencia conocida sobre la toxicidad podrá estar presente en concentraciones que puedan interferir.

E. BIENESTAR DE LOS ANIMALES

Se prestará la debida consideración al bienestar de los animales cuando se elaboren los métodos de ensayo. A continuación se dan algunos breves ejemplos, sin que la lista sea exhaustiva. Los términos exactos o las condiciones precisas se encontrarán en el texto de los métodos.

- Para la determinación de la toxicidad oral aguda, deben considerarse dos métodos alternativos, el "método de dosis fija" y el "método de clase tóxica aguda". El "método de dosis fija" no utiliza la muerte como parámetro específico y exige menos animales. El "método de clase tóxica aguda" emplea como media un 70 % menos de animales que el método B.1 para la toxicidad oral aguda. Cualquiera de estos métodos alternativos producen menos dolor y sufrimiento que la metodología clásica.

- El número de animales utilizados se reduce al mínimo científicamente aceptable: solamente se someten a este ensayo 5 animales del mismo sexo por nivel de dosis en los métodos B.1 y B.3; solamente se utilizan 10 animales (y sólo 5 en el grupo de control negativo) para la determinación de la sensibilización de la piel en el ensayo de maximización en cobaya (método B.6); se reduce también el número de animales que se necesitan para el control positivo cuando se estudia la mutagenicidad in vivo (métodos B.11 y B.12).

- Se reducen al mínimo el dolor y el sufrimiento de los animales durante los ensayos: puede ser preciso sacrificar de forma compasiva a los animales que muestren signos intensos y continuados

de dolor y sufrimiento; no es preciso administrar sustancias de ensayo de una forma determinada cuando se sepa que de esta forma se provoca intenso dolor y sufrimiento debido a las propiedades corrosivas o irritantes de la sustancia (métodos B.1, B.2 y B.3).

- Se evita la realización de ensayos con dosis innecesariamente altas mediante la introducción de ensayos límite, no sólo en los ensayos de toxicidad aguda (métodos B.1, B.2 y B.3) sino también en los ensayos in vivo de mutagenicidad (métodos B.11 y B.12).

- Una estrategia actual de ensayos para examinar la irritación permite no realizar un ensayo, o reducirlo a un estudio con un solo animal, si se pueden proporcionar pruebas científicas suficientes.

Dichas pruebas científicas pueden basarse en las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, en los resultados de otros ensayos previamente realizados, o en los resultados de ensayos in vitro bien validados. Por ejemplo, si se ha llevado a cabo un estudio de toxicidad aguda por vía dérmica con la dosis del ensayo límite de la sustancia (método B.3) y no se ha observado irritación de la piel, puede no ser necesario seguir estudiando la irritación cutánea (método B.4); las sustancias que hayan mostrado capacidad de corrosión evidente o irritación grave de la piel en un estudio de irritación cutánea (método B.4) no deben someterse posteriormente a ensayos de irritación ocular (método B.5).

F. ENSAYOS ALTERNATIVOS

Constituye un objetivo científico de la Unión Europea la elaboración y validación de técnicas alternativas que puedan proporcionar el mismo nivel de información que los actuales ensayos con animales, pero utilizando menos animales, provocando menos sufrimiento o evitando completamente el uso de animales.

Tales métodos, según vayan existiendo, deben tenerse en cuenta siempre que sea posible para la caracterización de riesgos y la correspondiente clasificación y etiquetado en función de los riesgos intrínsecos.

G. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

A la hora de evaluar e interpretar los ensayos, deben tenerse en cuenta las limitaciones de la extrapolación directa al hombre de los resultados de los estudios realizados in vitro o con animales y, en consecuencia, deben utilizarse pruebas de la aparición de efectos adversos en personas, siempre que sea posible, a fin de confirmar los resultados de los ensayos.

Estos resultados pueden utilizarse para la clasificación y el etiquetado de los productos químicos, nuevos y existentes, respecto a sus efectos sobre la salud humana, en función de sus propiedades intrínsecas, observadas y cualificadas por estos métodos. Los criterios correspondientes del Anexo VI de clasificación y etiquetado también hacen referencia a los parámetros de los protocolos incluidos en estos métodos de ensayo.

Estos resultados pueden utilizarse también en los estudios de evaluación del riesgo de productos químicos nuevos y existentes. En los documentos correspondientes de orientación se indican las estrategias apropiadas de ensayo con estos fines.

H. BIBLIOGRAFÍA

La mayoría de estos métodos se han elaborado en el marco del programa de la OCDE de líneas directrices de ensayo, y deben realizarse de conformidad con los principios de buenas prácticas de laboratorio, a fin de garantizar la "aceptación mutua de datos" lo más amplia posible.

Puede encontrarse información adicional en las referencias que se dan en las directrices de la OCDE y en otras publicaciones relacionadas

B. 1. ter

TOXICIDAD AGUDA (ORAL): MÉTODO DE CLASE TÓXICA AGUDA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El método de clase tóxica aguda proporciona información destinada tanto a la evaluación de los riesgos como a su clasificación.

El método emplea tres dosis fijas, separadas de forma conveniente para permitir la clasificación del compuesto a partir de los resultados del estudio. Además, el procedimiento descrito en el presente método de ensayo permite la selección de tres dosis fijas adicionales, que pueden utilizarse como alternativas en alguna fase determinada o como opciones de ensayos complementarios. El uso de dosis adicionales puede considerarse en caso de que se desee o se necesite afinar más.

El método utiliza dosis iniciales definidas y con él no se pretende calcular una DL_{50} precisa, sino determinar una gama de exposición en la que puede esperarse la aparición de letalidad, ya que la muerte de una parte de los animales sigue siendo su parámetro principal. Los resultados del ensayo deben permitir la clasificación con arreglo a los criterios del Anexo VI. Debido a la naturaleza secuencial del enfoque, la duración del ensayo puede ser superior a la del procedimiento descrito en el método B.1. La ventaja principal del presente método consiste en que requiere un número menor de animales que el método de toxicidad aguda (oral) (B.1) o el método alternativo de dosis fija (B.1 *bis*).

Véase también la introducción general de la Parte B.

1.2. Definiciones

Véase la introducción general de la Parte B.

1.3. Principio del método

La sustancia se administra por vía oral a un grupo de animales de experimentación a una de las dosis definidas. La sustancia se somete a ensayo según un procedimiento por fases, utilizándose en cada fase tres animales del mismo sexo. No es necesario realizar un estudio previo de observación. Según la ausencia o presencia de mortalidad de los animales en relación con la sustancia recibida en una fase determinada se decidirá cual es la fase siguiente, es decir:

- no es necesario seguir con el ensayo
- la fase siguiente se realizará con la misma dosis, pero con animales del otro sexo
- la siguiente fase se realizará con la siguiente dosis superior o inferior.

1.4. Descripción del método

1.4.1. Preparación

Se seleccionan al azar animales jóvenes sanos, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes del inicio del estudio, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por sexo y dosis, pero el número de animales de cada jaula no debe obstaculizar la realización de observaciones claras de cada animal.

La sustancia estudiada se administra en una sola dosis a los animales directamente con sonda gástrica o cánula adecuada de intubación.

En caso necesario, la sustancia estudiada se disolverá o suspenderá en un vehículo adecuado. Se recomienda que, siempre que sea posible, se considere en primer lugar la utilización de una suspensión o solución acuosa, después una solución o emulsión en aceite (por ejemplo, aceite de maíz) y, finalmente, la disolución en otros vehículos. En caso de vehículos no acuosos, deben conocerse las características tóxicas del vehículo y, si se desconocen, deberán determinarse antes de realizar el ensayo.

Los animales se mantienen en ayuno antes de la administración (por ejemplo, desde el día anterior en el caso de la rata, o durante tres o cuatro horas en el caso del ratón). No debe retirarse el agua.

1.4.2. *Condiciones del ensayo*

1.4.2.1. *Animales de laboratorio*

A no ser que existan contraindicaciones, la especie preferida de roedor es la rata. Las hembras serán nulpáras y no grávidas.

Al inicio del estudio, la variación en peso de los animales será mínima y no superará el $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.4.2.2. *Número y sexo*

Se utilizan en cada fase tres animales de un mismo sexo. En la fase inicial puede utilizarse cualquiera de los dos sexos.

1.4.2.3. *Dosis*

La dosis inicial se seleccionará entre las tres dosis fijas, es decir, 25, 200 y 2 000 mg/kg de peso corporal. La dosis inicial será la que produzca con mayor probabilidad mortalidad de al menos uno de los animales a los que se administre. Podrá utilizarse uno de los diagramas de flujo de los procedimientos descritos en el Anexo I, en función de la dosis inicial.

Para seleccionar el sexo y la dosis inicial deberá evaluarse toda la información disponible, incluida la información sobre la relación estructura-actividad. Cuando la información sugiera que no es probable la aparición de mortalidad con la dosis máxima (2 000 mg/kg peso corporal), se realizará una prueba límite. Si no hay información sobre una sustancia estudiada, se recomienda utilizar, por razones de bienestar de los animales, como dosis inicial 200 mg/kg peso corporal.

A veces puede desearse tener una información más detallada de lo que sería posible obtener tras realizar el ensayo con las tres dosis fijas 25, 200 y 2 000 mg/kg peso corporal. En estos casos, puede considerarse la posibilidad de realizar pruebas complementarias con las dosis fijas adicionales de 5, 50 ó 500 mg/kg peso corporal.

No será necesario administrar dosis de las que se sepa que producen dolor y sufrimiento acusados, debido a sus acciones corrosivas o gravemente irritantes.

El intervalo de tiempo entre los grupos de tratamiento se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de animales del otro sexo, o con la dosis siguiente, no se realizará hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados.

1.4.2.4. *Ensayo límite*

Podrá realizarse un ensayo límite con una sola dosis de 2 000 mg/kg peso corporal con tres animales de cada sexo. Si aparece mortalidad debida a la sustancia, puede ser necesario realizar una prueba complementaria con 200 (ó 500) mg/kg de peso corporal.

1.4.2.5. *Período de observación*

Los animales deben someterse a observación durante 14 días en principio, salvo los que se encuentran muertos o sea necesario eliminar del estudio y sacrificar de forma compasiva por razones de bienestar animal. No obstante, la duración del período de observación no debe fijarse de forma rígida, sino que debe determinarse según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la longitud del período de recuperación, por lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal.

1.4.3. *Procedimiento*

Tras el período de ayuno, los animales se pesarán antes de la administración de la sustancia estudiada. Una vez administrada esta sustancia, podrá continuarse el ayuno durante unas 3 ó 4 horas. Cuando una dosis se administre en fracciones a lo largo de un período, podrá ser necesario proporcionar a los animales alimento y agua, en función de la duración del período.

El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una vez depende del tamaño del animal utilizado. En el caso de los roedores, el volumen no debe superar en principio 1 ml/100 g de peso corporal; no obstante, en el caso de las soluciones acuosas puede considerarse la posibilidad de administrar 2 ml/100 g de peso corporal. La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Si no es posible utilizar una dosis única, podrá administrarse la sustancia en fracciones menores a lo largo de un período que no excederá de 24 horas.

En el Anexo I se dan detalles del procedimiento del ensayo.

1.4.3.1. Observaciones generales

Deben hacerse observaciones clínicas cuidadosas el menos dos veces en el día de la administración, o con mayor frecuencia si así lo indica la respuesta de los animales al tratamiento, y posteriormente al menos una vez al día. Los animales moribundos y los que muestren dolor intenso y signos de sufrimiento continuo deberán sacrificarse de forma compasiva. Los animales sacrificados por razones compasivas se considerarán de la misma forma que los animales que hayan muerto durante la prueba.

Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte. Será necesario proceder a observaciones adicionales si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Entre las observaciones deben incluirse los cambios de la piel y del pelaje, ojos y membranas mucosas, y también de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso (central y autónomo), así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma.

Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal.

1.4.3.2. Peso corporal

Todos los animales se pesarán justo antes de la administración de la sustancia, y después al menos una vez por semana. Se calcularán y registrarán los cambios de peso. Al final de la prueba, los animales supervivientes se pesarán antes de sacrificarse de forma compasiva.

1.4.3.3. Necropsia macroscópica

Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio, se someterán a necropsia macroscópica. Se registrarán los cambios patológicos macroscópicos de cada animal. Podrá considerarse también la realización del examen microscópico de los órganos que presenten huellas de patología macroscópica, en los animales que sobrevivan un mínimo de 24 horas, ya que este examen puede proporcionar información útil.

2. RESULTADOS

Deben proporcionarse los resultados de cada animal por separado. Además, se reunirán todos los resultados en forma de un cuadro que presente para cada grupo de ensayo el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, una descripción de la evolución temporal de los efectos tóxicos y su reversibilidad, y las observaciones hechas durante la necropsia.

En el Anexo 2 se dan unas orientaciones generales sobre la interpretación de los resultados con vistas a la clasificación.

3. INFORME

Informe del ensayo

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

Animales de ensayo:

- especie/variedad
- situación microbiológica de los animales, cuando se conozca
- número, edad y sexo de los animales
- procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- peso de cada animal al inicio del ensayo, a intervalos semanales durante el ensayo, y al final de éste.

Condiciones del ensayo:

- justificación de la elección del vehículo, en caso de que no sea agua
- datos de la administración de la sustancia, incluidos el volumen y el momento de la administración
- datos sobre la calidad del agua y los alimentos (incluidos su tipo y origen)
- justificación de la elección de la dosis inicial.

Resultados:

- tabulación de los datos de las repuestas por sexo y dosis de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad, naturaleza, gravedad y duración de los efectos)
- cronología de la aparición de signos de toxicidad y si éstos son reversibles en cada animal
- observaciones de la necropsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Discusión de los resultados

Conclusiones

4. **BIBLIOGRAFÍA**

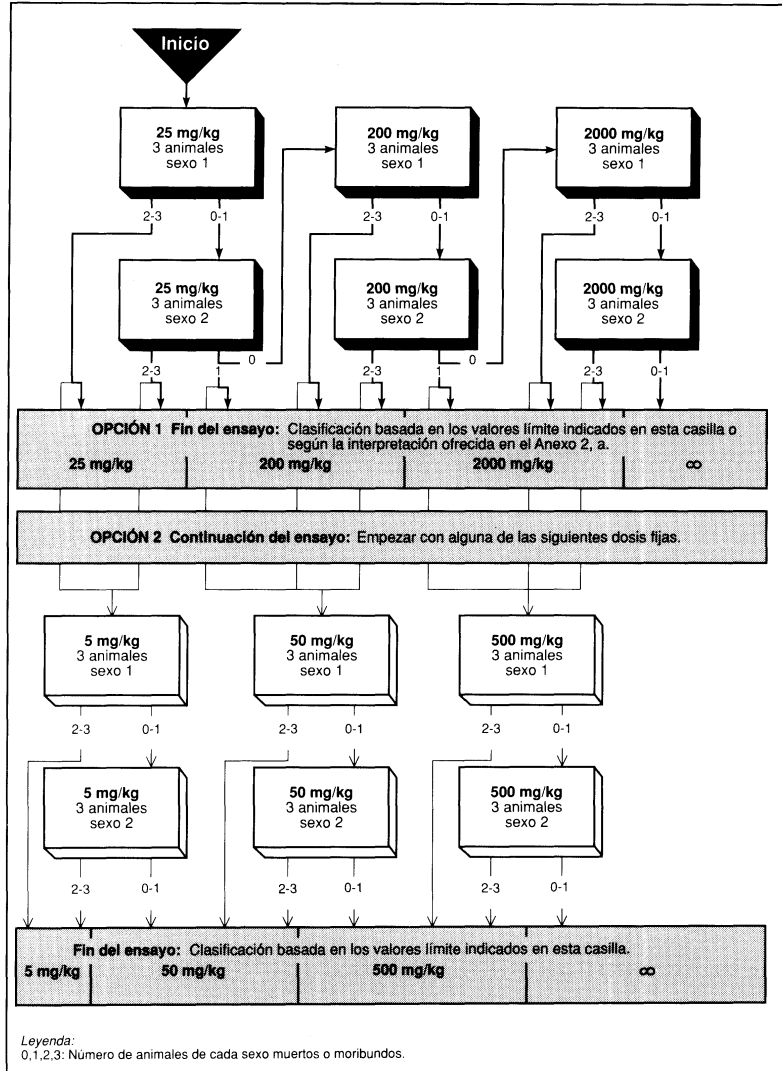
El presente método es análogo a la TG 423 de la OECD.

ANEXO 1

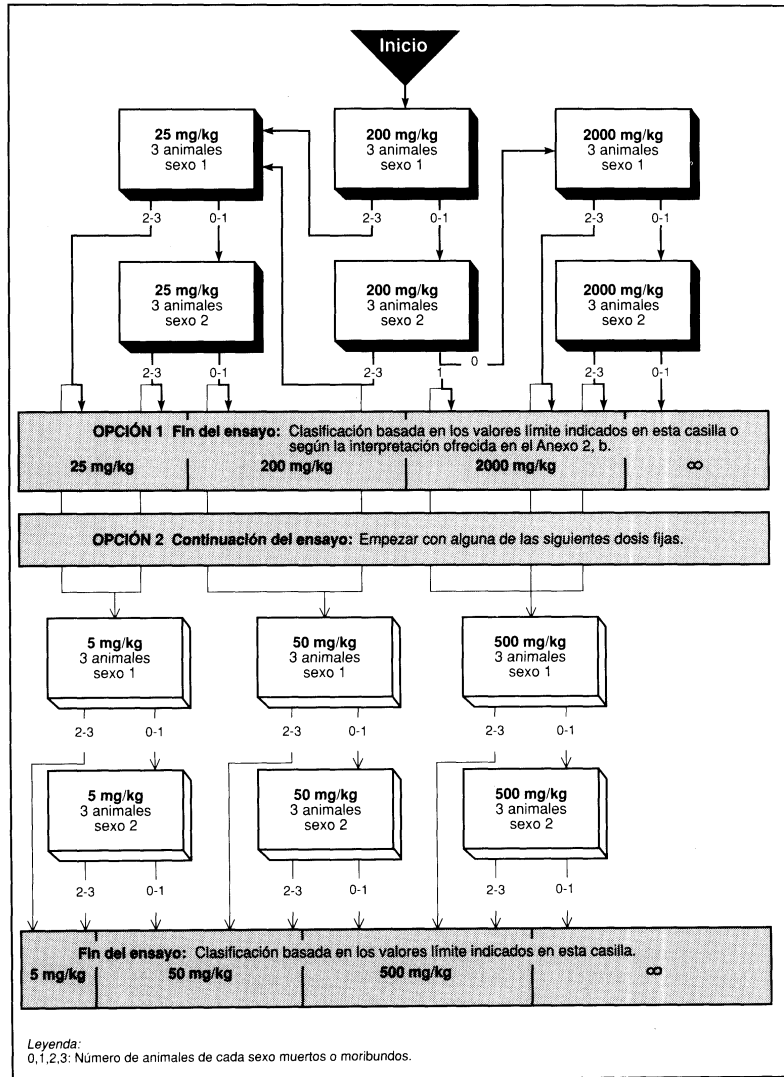
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Como se indica en el punto 1.4.2.3, la dosis inicial debe ser la que probablemente produzca mortalidad en al menos uno de los animales a que se administre. Para seleccionar estas dosis inicial puede utilizarse la siguiente información:
 - datos sobre las propiedades fisicoquímicas
 - relación estructura-actividad
 - todos los datos procedentes de otras pruebas de toxicidad
 - uso previsto de la sustancia estudiada.
2. Para cada dosis inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo, incluidos en el presente Anexo. En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.
3. Cuando con una dosis inicial de 25 ó 200 mg/kg de peso corporal sólo muera un animal del segundo sexo, normalmente no hay que continuar con el ensayo. No obstante, si no se observa ningún signo tóxico en los otros cinco animales, durante la autopsia debe considerarse la posibilidad de que la mortalidad no se haya debido a la sustancia. En tal caso, el ensayo debe continuar con una dosis del siguiente nivel superior.
4. Cuando con la dosis de 2 000 mg/kg de peso corporal muera un solo animal por sexo, se supone que la DL_{50} supera los 2 000 mg/kg de peso corporal. No obstante, dado que se trata de un resultado límite, la respuesta de los otros dos animales de cada sexo debe estudiarse cuidadosamente, y la aparición de signos tóxicos inconfundibles y marcados en estos animales puede hacer que la clasificación corresponda a una DL_{50} de 2 000 mg/kg de peso corporal o menos, o puede justificar la necesidad de continuar los ensayos con este mismo nivel.
5. El procedimiento permite la realización de ensayos con tres dosis fijas adicionales (opción 2). Esta opción puede utilizarse bien para seleccionar una dosis alternativa en un punto dado del proceso, o bien para realizar ensayos complementarios una vez terminado el ensayo en sí (opción 1). En la opción 1, el procedimiento de ensayo se indica con flechas en negrita, mientras que para la opción 2 el procedimiento de ensayo sigue las flechas finas.

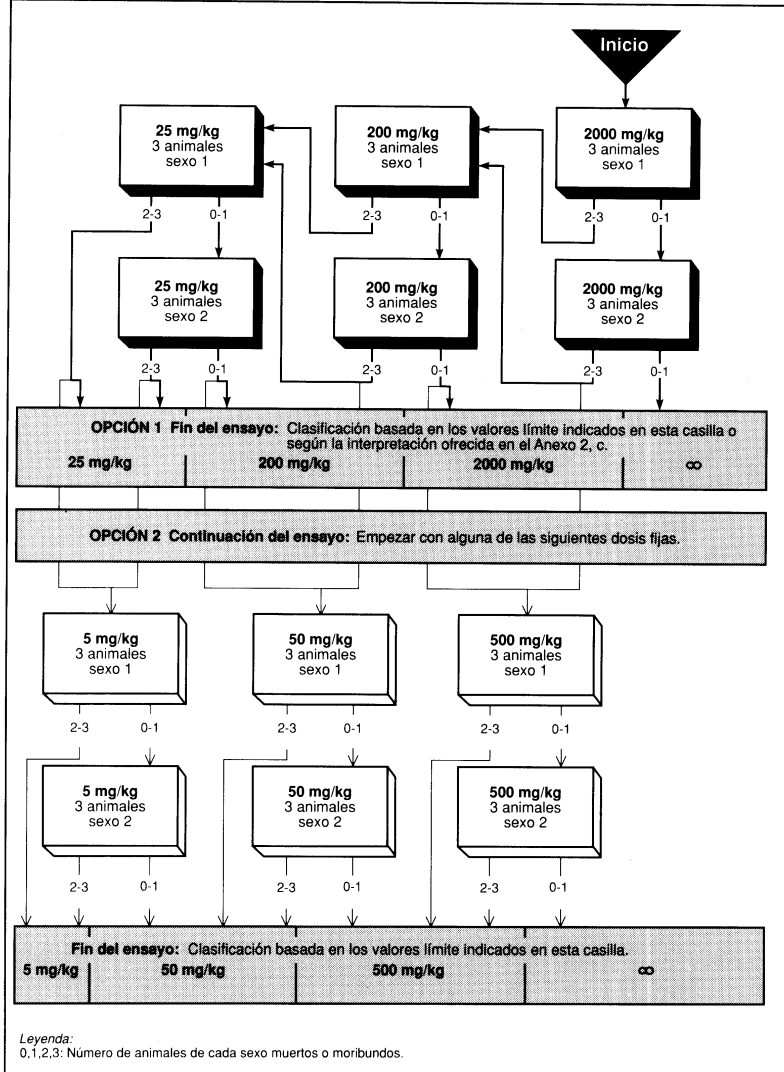
a) Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 25 mg/kg de peso corporal



b) Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 200 mg/kg de peso corporal



c) Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 2000 mg/kg de peso corporal



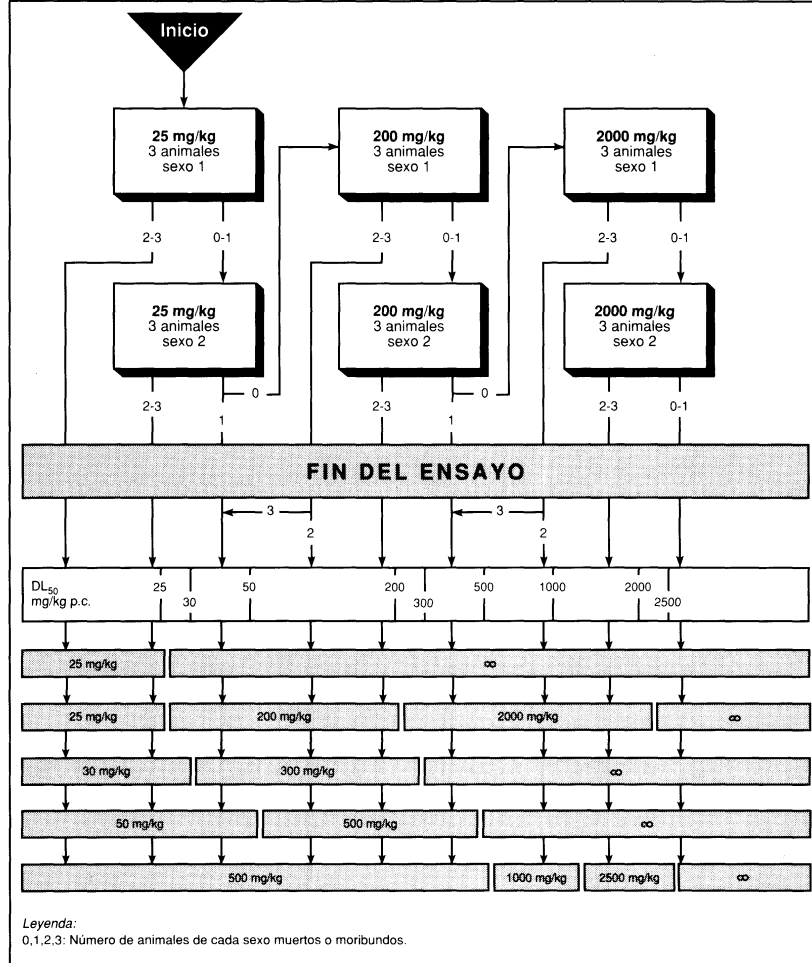
ANEXO 2

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO CON LA OPCIÓN 1

Las casillas sombreadas debajo de la casilla de «Fin del ensayo» en los esquemas del presente Anexo representan valores límites para la clasificación. Según el procedimiento de ensayo expuesto en la opción 1, debe seguirse hacia abajo la flecha adecuada, hasta llegar a la casilla sombreada correspondiente.

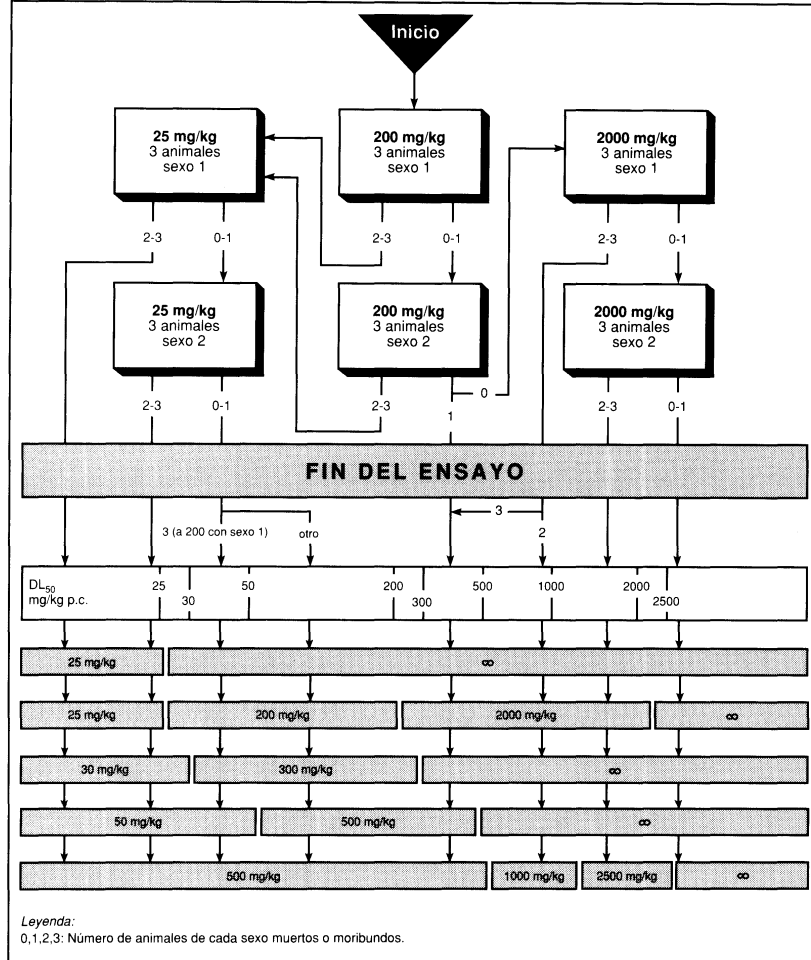
a) Interpretación de los resultados obtenidos en el ensayo con la opción 1

Dosis inicial: 25 mg/kg de peso corporal



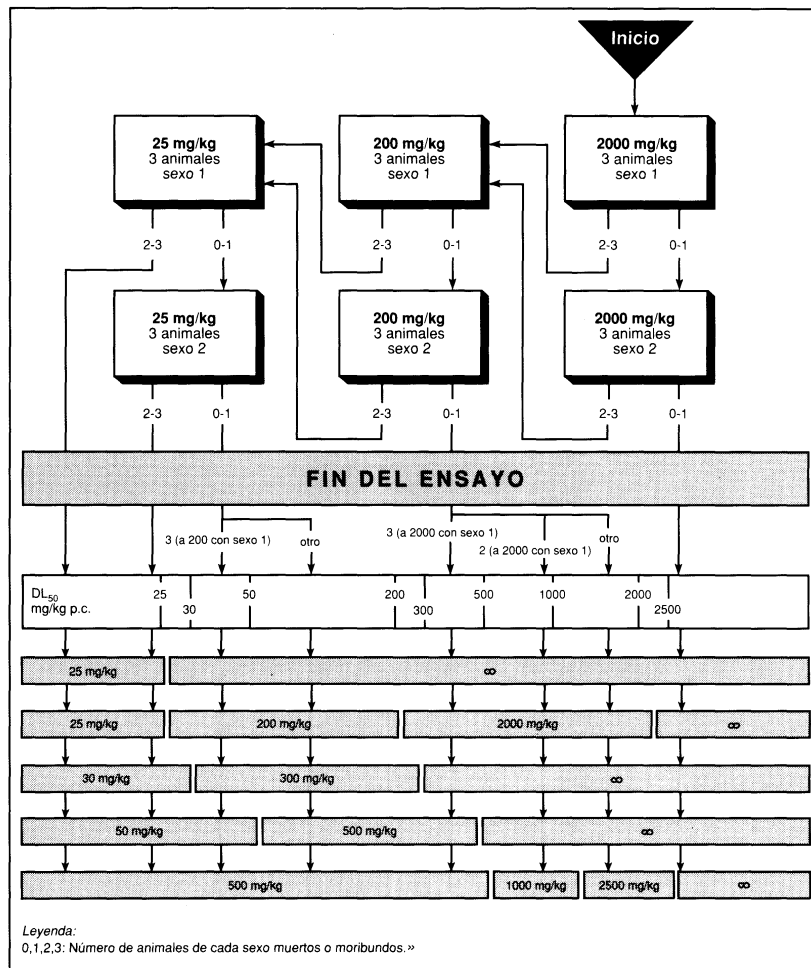
b) Interpretación de los resultados obtenidos en el ensayo con la opción 1

Dosis inicial: 200 mg/kg de peso corporal



c) Interpretación de los resultados obtenidos en el ensayo con la opción 1

Dosis inicial: 2 000 mg/kg de peso corporal



B.2. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es útil disponer de información preliminar sobre la distribución del tamaño de partícula, la presión de vapor, el punto de fusión, el punto de ebullición, el punto de inflamación y la detonabilidad (si procede) de la sustancia.

Véase también la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIONES

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen varios lotes de animales de laboratorio a la sustancia de ensayo a concentraciones diferentes durante un período determinado, utilizándose una sola concentración por lote. Se observan a continuación los efectos y la mortalidad debidos a la sustancia. Se realiza la autopsia a los animales que mueran durante el experimento así como, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido.

Los animales que muestren signos de angustia y dolor graves y duraderos deberán sacrificarse de forma humanitaria. No se administrarán sustancias que produzcan dolor y angustia graves debido a sus propiedades corrosivas o irritantes.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento por lo menos durante los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se eligen al azar animales jóvenes sanos y se reparten entre los diferentes lotes del experimento. No es necesario someterlos a una exposición simulada, a menos que lo exija el dispositivo de exposición utilizado.

Puede ser necesario micronizar las sustancias sólidas para conseguir partículas del tamaño adecuado.

Si es preciso, se puede añadir la sustancia a un vehículo adecuado para obtener una concentración apropiada de aquella en la atmósfera, en cuyo caso se utilizará un grupo testigo para dicho vehículo. Si para facilitar la dosificación se utiliza un vehículo u otros aditivos, no deberán producir efectos tóxicos. Pueden utilizarse resultados disponibles ya comprobados, siempre que sean apropiados.

1.6.2. Condiciones del ensayo

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Salvo indicación contraria, la rata es la especie idónea. Es preciso utilizar cepas de laboratorio corrientes. Para cada sexo, la diferencia de peso al comienzo de la prueba entre los animales utilizados en el ensayo no debe exceder de ± 20 % del valor medio apropiado.

1.6.2.2. Número y sexo

Para cada nivel de concentración se utilizarán al menos diez roedores (5 hembras y 5 machos). Las hembras deberán ser nulíparas y no grávidas.

Nota: Se considerará la posibilidad de utilizar un número menor de animales cuando se realicen ensayos de toxicidad aguda con animales de un orden superior al de los roedores. Las dosis se seleccionarán cuidadosamente y se hará todo lo posible por no sobrepasar dosis moderadamente tóxicas. Se evitará en esos ensayos la administración de dosis letales de la sustancia de ensayo.

1.6.2.3. Concentraciones de exposición

Las concentraciones deben ser en número suficiente, al menos tres, y espaciadas adecuadamente para producir lotes que presenten variedad de efectos tóxicos y de tasas de mortalidad. Los resultados deben ser suficientes para que se pueda trazar una curva concentración/mortalidad y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la CL50.

1.6.2.4 Prueba límite

Si una exposición de cinco machos y cinco hembras a una concentración de 20 mg por litro de un gas o 5 mg por litro de un aerosol o de partículas durante cuatro horas (o, si ello no fuera posible debido a las propiedades físicas o químicas, incluso explosivas, de la sustancia de prueba, a la concentración máxima posible) no causa la muerte de ningún animal en 14 días, se podrá considerar innecesaria la prosecución del experimento

1.6.2.5. Duración de la exposición

La duración de la exposición debe ser de 4 horas.

1.6.2.6. Equipo experimental

Los animales deben exponerse a la sustancia por medio de un dispositivo de inhalación que produzca un flujo dinámico de, por lo menos, 12 renovaciones de aire por hora, para garantizar un contenido de oxígeno suficiente y la distribución uniforme del producto de ensayo en la atmósfera. Si se utiliza una cámara, debe estar concebida de forma que se evite, en lo posible, el amontonamiento de los animales y que su exposición máxima por inhalación de la sustancia quede asegurada. Por regla general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera, el «volumen» total de animales de laboratorio no debe sobrepasar el 5 % del volumen de la cámara de ensayo. También se puede recurrir a un sistema de exposición oro-nasal, únicamente de cabeza o de cuerpo entero, en una cámara individual; con los dos primeros tipos de exposición se evita la absorción de la sustancia por otras vías.

1.6.2.7. Período de observación

El período de observación debe ser por lo menos de 14 días. No obstante, su extensión no debe fijarse de forma rígida, sino que debe determinarse en función de las reacciones de toxicidad, de su velocidad de aparición y de la duración del período de recuperación; por lo tanto, en caso de necesidad puede prolongarse. Son importantes el momento en que aparecen y desaparecen los síntomas de toxicidad, así como el momento de la muerte, sobre todo si en la sustancia se observa una tendencia a causar una muerte retardada.

1.6.3. Procedimiento

Poco tiempo antes de la exposición, se pesan los animales y, a continuación, se exponen a la concentración de ensayo en el equipo descrito, durante 4 horas, una vez que se haya estabilizado la concentración en la cámara. La estabilización debe ser rápida. La temperatura durante el ensayo debe mantenerse a 22 ± 3 C. Lo ideal sería mantener la humedad relativa entre el 30 y el 70 % pero en ciertos casos (por ejemplo, en la prueba de algunos aerosoles) esto puede resultar

imposible. El mantener una ligera presión negativa dentro de la cámara (≤ 5 mm de agua) evitará la dispersión de la sustancia de ensayo en la zona circundante. Se privará de alimento y de agua a los animales durante la exposición. Se utilizarán sistemas apropiados para crear y controlar la atmósfera de ensayo. El sistema debe permitir crear condiciones de exposición estables lo más rápidamente posible. La cámara se diseñará y funcionará de forma que se mantenga en su interior una distribución homogénea de la atmósfera del ensayo.

Es conveniente medir o vigilar:

(a) el caudal de aire (permanentemente);

(b) la concentración real de la sustancia de ensayo en la zona de respiración, al menos tres veces durante la exposición (algunas atmósferas, p. ej., aerosoles a altas concentraciones, necesitarán una vigilancia más frecuente). Durante el período de exposición, la concentración no debe variar en más de ± 15 % respecto al valor medio. Sin embargo, en el caso de ciertos aerosoles puede ser difícil conseguir este control, en cuyo caso se puede aceptar una diferencia mayor. En los aerosoles, debe analizarse el tamaño de las partículas tan a menudo como sea necesario (al menos una vez por grupo de ensayo);

(c) temperatura y humedad, si es posible continuamente;

Las observaciones tienen lugar durante y después de la exposición y se registran sistemáticamente; debe abrirse una ficha individual para cada animal. El primer día deben efectuarse con frecuencia las observaciones. Deberá hacerse un examen clínico cuidadoso al menos cada día laborable. Diariamente se harán otras observaciones complementarias actuando de manera que se reduzca la pérdida de animales para el estudio, por ejemplo, mediante autopsia o refrigeración de los animales muertos, así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos.

La observación incluirá las modificaciones de la piel y del pelo, los ojos, las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Deben observarse con especial atención la respiración, los temblores, las convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma. El momento de la muerte debe registrarse con la mayor precisión posible. El peso de cada animal deberá determinarse semanalmente después de la exposición, así como en el momento de la muerte. Se hará la autopsia a los animales que mueran durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido. Deben registrarse, especialmente, las modificaciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, anotando todos los cambios patológicos importantes. Si es necesario, se extraerán tejidos para un examen histopatológico.

2. RESULTADOS

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada grupo de ensayo, el número de animales al principio del mismo, el momento de la muerte de cada animal, el número de animales que presenten otros síntomas de toxicidad, la descripción de los efectos tóxicos y los resultados de la autopsia. Las variaciones de peso deben calcularse y registrarse cuando la supervivencia del animal supere un día. Los animales sacrificados por razones humanitarias debido a angustia o dolor producidos por la sustancia se registrarán como muertes debidas a la sustancia. La CL50 debe determinarse mediante un método reconocido. La evaluación de los resultados debe incluir la posible relación que existe entre la exposición de los animales a la sustancia y la incidencia y gravedad de todas las anomalías, incluidas las anomalías clínicas y de comportamiento, las lesiones macroscópicas, los cambios de peso corporal, la mortalidad y demás efectos tóxicos.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.;
- condiciones del ensayo: Descripción del dispositivo de exposición, incluidos su concepción, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema generador de aerosoles, método de acondicionamiento del aire y, en su caso, método de alojamiento de los animales en la cámara de ensayo. Debe describirse el equipo utilizado para medir la temperatura y la humedad, así como la concentración de los aerosoles y la granulometría de las partículas.

Datos relativos a la exposición

Deben presentarse en forma de tabla, indicando los valores medios así como una medida de la variabilidad (por ejemplo desviación típica); a ser posible, deben incluir;

- (a) el caudal de aire a través del dispositivo de inhalación,
- (b) temperatura y humedad del aire,
- (c) concentraciones nominales (cantidad total de sustancia de ensayo introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire),
- (d) en su caso, naturaleza del vehículo,
- (e) concentraciones reales en la zona de respiración,
- (f) el diámetro aerodinámico de la mediana de la masa (DAMM) y la desviación geométrica típica (DGT),
- (g) duración de la estabilización,
- (h) duración de la exposición,
- tabla de reacciones, por sexo y por nivel de exposición (número de animales que mueren o se sacrifican durante el ensayo, número de animales que presentan síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),
- momento de la muerte, durante o después de la exposición, motivos y criterios para el sacrificio humanitario de los animales,
- observaciones de cualquier tipo,
- valor de la CL50 para cada sexo, determinado al final del período de observación (indicando con precisión el método de cálculo utilizado),
- intervalo de confianza estadística del 95 % para la CL50 (si es posible determinarlo),
- curva concentración/mortalidad y pendiente de la curva (si el método de cálculo lo permite),
- resultados de las autopsias,
- toda observación histopatológica,
- discusión de los resultados (prestando especial atención al efecto que pueda tener sobre el valor calculado de CL50 el sacrificio humanitario de animales durante el ensayo,
- interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.3. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA CUTÁNEA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIONES

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se administran dosis diferentes de la sustancia de ensayo por aplicación cutánea a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis por lote. Se observan a continuación los efectos y la mortalidad causados por la sustancia. Se realiza la autopsia a los animales que mueran durante el ensayo así como al final de ésta, a los que hayan sobrevivido.

Los animales que muestren signos de dolor y angustia graves y duraderos deberán sacrificarse de forma humanitaria. No se administrarán sustancias que produzcan dolor y angustia graves debido a sus propiedades corrosivas o irritantes.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las jaulas para el experimento en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el ensayo por lo menos durante los 5 días anteriores. Antes de comenzar el ensayo se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos y se reparten entre los diferentes lotes del ensayo. Unas veinticuatro horas antes del ensayo se esquila o se rasura el pelo de la región dorsal del tronco de los animales, evitando cualquier lesión de la piel que pueda modificar su permeabilidad. La superficie que hay que preparar para la aplicación de la sustancia no debe ser inferior al 10 % de la superficie corporal. Cuando se sometan a ensayo sólidos, que puedan pulverizarse eventualmente, la sustancia deberá humedecerse con agua o, si es preciso, con un vehículo adecuado, para asegurar un buen contacto con la piel. Si se utiliza un vehículo, se habrá de tener en cuenta su incidencia sobre la penetración de la sustancia en la piel. Las sustancias líquidas, generalmente, se aplican sin diluir.

1.6.2. Condiciones del ensayo

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Se pueden utilizar ratas o conejos adultos. Se pueden utilizar igualmente otras especies pero, en tal caso, hay que justificar su utilización. Es preciso utilizar cepas de laboratorio corrientes. Para cada sexo, la diferencia de peso al comienzo del ensayo entre los animales utilizados no debe exceder de ± 20 % del valor medio apropiado.

1.6.2.2. Número y sexo

Para cada dosis se utilizarán al menos 5 animales del mismo sexo. Si se utilizan hembras, deberán ser nulíparas y no grávidas. Cuando se disponga de información que demuestre que un

sexo es mucho más sensible, se utilizarán para la prueba animales de ese sexo.

Nota: Se considerará la posibilidad de utilizar un número menor de animales cuando se realicen ensayos de toxicidad aguda con animales de un orden superior al de los roedores. Las dosis se seleccionarán cuidadosamente y se hará todo lo posible por no sobrepasar dosis moderadamente tóxicas. Se evitará en esos ensayos la administración de dosis letales de la sustancia de estudio.

1.6.2.3. Dosis

Las dosis deben ser en número suficiente, al menos tres, y espaciadas adecuadamente para producir lotes que presenten variedad de efectos tóxicos y de mortalidad. Al elegir las dosis debe tomarse en consideración cualquier efecto irritante o corrosivo. Los resultados deben ser suficientes para que se pueda trazar una curva dosis/respuesta y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la DL50.

1.6.2.4. Prueba límite

Puede realizarse un ensayo límite, con dosificación única de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal, en un grupo de 5 machos y 5 hembras, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Si hay mortalidad debida a la sustancia, habrá que considerar la realización de un estudio completo.

1.6.2.5. Período de observación

El período de observación debe ser de, al menos, 14 días. Sin embargo, su extensión no debe fijarse de forma rígida, sino que debe determinarse en función de las reacciones de toxicidad, su velocidad de aparición y la duración del período de curación; por lo tanto, puede prolongarse en caso de necesidad. Es importante el momento en el que aparecen y en el que desaparecen los síntomas de toxicidad, así como el momento de la muerte, sobre todo si se observa en la sustancia una tendencia a causar una muerte retardada.

1.6.3. Procedimiento

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. La sustancia debe aplicarse sobre una superficie equivalente al 10 % de la superficie total del cuerpo. En el caso de sustancias altamente tóxicas la superficie puede ser menor, pero procurando que en toda la superficie la sustancia forme una película lo más fina y uniforme posible.

Las sustancias de ensayo deben mantenerse en contacto con la piel por medio de un apósito de gasa porosa y un esparadrapo no irritante durante 24 horas. Además, la parte tratada debe estar convenientemente cubierta para mantener en su lugar el apósito de gasa y la sustancia e impedir que los animales puedan ingerir esta última. Se pueden utilizar aparatos de contención para impedir que los animales ingieran la sustancia, pero no se recomienda una inmovilización completa.

Al término del período de aplicación de la sustancia de ensayo, ésta deberá eliminarse, a ser posible, con agua o con otro procedimiento adecuado de limpieza de la piel.

Las observaciones se registrarán sistemáticamente a medida que se efectúen, abriendo una ficha individual para cada animal. El primer día las observaciones deben efectuarse con frecuencia. Deberá hacerse un examen clínico atento al menos cada día laborable. Diariamente deberán hacerse otras observaciones actuando de manera que se reduzca el número de animales perdidos para el estudio, por ejemplo mediante autopsia o refrigeración de los animales muertos, así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos.

Las observaciones deben incluir las modificaciones del pelo, la piel tratada, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Deben observarse con especial atención los temblores, las convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma. El momento de la muerte debe anotarse con la mayor precisión posible. Se hará la autopsia a los

animales que mueran durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido. Deben registrarse todas las modificaciones patológicas macroscópicas. Si es necesario se extraerán tejidos para un examen histopatológico posterior.

Valoración de la toxicidad en el otro sexo

Tras completar el estudio en uno de los sexos, se hará un estudio con al menos un grupo de 5 animales del sexo contrario, de forma que quede establecido que los animales de este sexo no son mucho más sensibles a la sustancia de ensayo. En circunstancias particulares podrá justificarse el uso de menor número de animales. Cuando se disponga de información adecuada que demuestre que los animales del sexo sometido a prueba son mucho más sensibles, podrá prescindirse del ensayo en animales del otro sexo.

2. RESULTADOS

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote, el número de animales al principio del ensayo, el momento de la muerte de cada animal, el número de animales que presenten otros síntomas de toxicidad, la descripción de los efectos tóxicos y los resultados de la autopsia. El peso de cada animal debe determinarse y anotarse poco antes de la aplicación de la sustancia y, después de la misma, una vez por semana y en el momento de su muerte; deben calcularse y registrarse las variaciones de peso cuando la supervivencia del animal supere un día. Los animales que se sacrifiquen de forma humanitaria debido a angustia o dolor causados por la sustancia se registrarán como muertes debidas a la sustancia. La DL50 debe determinarse mediante un método reconocido.

La evaluación de los resultados debe incluir la eventual relación que exista entre la exposición de los animales a la sustancia y la incidencia y gravedad de todas las anomalías, incluidas las anomalías clínicas y del comportamiento, las lesiones macroscópicas, los cambios de peso corporal, la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.;
- condiciones de ensayo (incluido el procedimiento de limpieza de la piel y el tipo de apósito: oclusivo o no oclusivo),
- dosis (indicando las concentraciones y, en su caso, el vehículo),
- sexo de los animales utilizados,
- tabla de respuestas por sexo y por dosis (número de animales que mueren o son sacrificados durante el ensayo, número de animales con síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),
- momento de la muerte después de administrar la dosis, motivos y criterios para el sacrificio humanitario de los animales,
- todas las observaciones,
- valor de la DL50 para el sexo sometido a un estudio completo, determinado el decimocuarto día, indicando con precisión el método de cálculo,
- intervalo de confianza estadística del 95 % para la DL50 (si es posible determinarlo),
- curva dosis/mortalidad y pendiente de la curva si el método de cálculo lo permite,
- resultados de la autopsia,
- observaciones histopatológicas,
- resultado de cualquier ensayo en el sexo contrario,
- discusión de los resultados (prestando especial atención al efecto que puede tener sobre la DL50 calculada el sacrificio humanitario de animales durante el ensayo),
- interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B. 6 SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Observaciones:

La sensibilidad y capacidad de los ensayos para detectar sustancias que pueden sensibilizar la piel humana se consideran importantes para un sistema de clasificación de la toxicidad aplicable a la salud pública.

No hay un método único que detecte todas las sustancias con potencial de sensibilización de la piel humana y que sea adecuado para todas las sustancias.

Para seleccionar un ensayo deben tenerse en cuenta factores como las características físicas de la sustancia, incluyendo su capacidad de penetración en la piel.

Se han elaborado dos tipos de ensayos que utilizan cobayas: los ensayos con coadyuvante, en los que se potencia un estado alérgico disolviendo o suspendiendo la sustancia estudiada en coadyuvante completo de Freund (FCA), y los ensayos sin coadyuvante.

Es probable que los ensayos con coadyuvante sean más exactos a la hora de predecir el efecto sensibilizante probable de una sustancia en la piel humana respecto a los métodos que no emplean el coadyuvante completo de Freund, por lo que son los métodos preferidos.

El ensayo de maximización en cobaya (GPMT) es un ensayo con coadyuvante ampliamente utilizado. Aunque se pueden utilizar otros métodos para detectar el potencial sensibilizante de una sustancia, se considera que el GMPT es la técnica con coadyuvante de preferencia.

Los ensayos sin coadyuvantes (suele utilizarse sobre todo el ensayo de Buehler) se consideran menos sensibles con muchas clases de productos químicos.

En ciertos casos puede haber buenas razones para escoger el ensayo de Buehler, que supone una aplicación tópica en vez de la inyección intradérmica utilizada en el ensayo de maximización en cobaya. Cuando se use el ensayo de Buehler deberá justificarse científicamente.

En el presente método se describen el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler. Se pueden utilizar otros métodos siempre que estén bien validados y se dé su justificación científica.

Si se obtiene un resultado positivo en un ensayo de cribado reconocido, podrá designarse una sustancia de ensayo como sensibilizante potencial y podrá no ser necesario realizar un nuevo ensayo con cobaya. No obstante, si se obtiene un resultado negativo en un ensayo semejante, deberá realizarse un ensayo con cobaya utilizando el procedimiento descrito en este método de ensayo.

Véase también la introducción general de la parte B.

1.2. Definiciones

Sensibilización de la piel (dermatitis alérgicas de contacto): es una reacción cutánea de origen inmunológico ante una sustancia. En los seres humanos las respuestas pueden caracterizarse por prurito, eritema, edema, pápulas, vesículas, ampollas o una combinación de estos fenómenos. En otras especies, las reacciones pueden ser diferentes y apreciarse sólo eritema y edema.

Exposición de inducción: exposición experimental de un sujeto a una sustancia con el fin de inducir un estado de hipersensibilidad.

Período de inducción: período de al menos una semana a partir de la exposición de inducción, durante el cual puede aparecer un estado de hipersensibilidad.

Exposición de provocación: exposición experimental de un sujeto previamente tratado a una sustancia después de un período de inducción, a fin de determinar si el sujeto reacciona de forma hipersensible.

1.3. Sustancias de referencia

La sensibilidad y fiabilidad de la técnica experimental utilizada deberá evaluarse cada seis meses mediante el empleo de sustancias conocidas como demosesibilizantes suaves o moderados.

En un ensayo realizado convenientemente, el empleo de un sensibilizante suave o moderado debe producir una respuesta del 30 % al menos en un ensayo con coadyuvante y del 15 % al menos en un ensayo sin coadyuvante.

Se recomiendan las siguientes sustancias:

Número CAS	Número EINECS	Denominación EINECS	Denominación común
101-86-0	202-983-3	α -hexilcinamaldehído	α -hexilcinamaldehído
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (mercaptobenzotiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaína	norcaína

En ciertas circunstancias se podrán utilizar otras sustancias de control que cumplan los criterios citados, justificándose debidamente su elección.

1.4. Principio del método

Los animales utilizados se exponen inicialmente a la sustancia mediante inyecciones intradérmicas o aplicación epidérmica (exposición de inducción). Tras un período de descanso de 10 a 14 días (período de inducción), durante el que puede desarrollarse la respuesta inmunitaria, los animales se someten a una dosis de provocación. La amplitud y el grado de la reacción cutánea de los animales ante la exposición de provocación se compara con la mostrada por animales de control que reciben un tratamiento simulado durante la inducción y se someten a la exposición de provocación.

1.5. Descripción de los métodos

Si se considera necesario eliminar la sustancia estudiada, puede hacerse utilizando agua o un disolvente adecuado que no altere la respuesta obtenida ni la integridad de la epidermis.

1.5.1. Prueba de maximización en cobaya (GPMT)

1.5.1.1. Preparación

Durante al menos 5 días antes del inicio del ensayo, se aclimatan a las condiciones del laboratorio cobayas albinos jóvenes y sanos. Antes del ensayo, los animales se eligen al azar y se asignan a los lotes de tratamiento. La eliminación del pelo se hace por corte, afeitado o incluso depilación química, en función del método de ensayo utilizado. Debe evitarse la producción de escoriaciones en la piel. Los animales se pesarán antes del ensayo y al final del mismo.

1.5.1.2. Condiciones del ensayo

1.5.1.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan cepas corrientes de laboratorio de cobaya albino.

1.5.1.2.2. Número y sexo

Se pueden utilizar animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras, deben ser nulíparas y no grávidas.

Se utilizan por los menos 10 animales para el lote tratado y, por lo menos, 5 para el lote testigo. Si se utilizan menos de 20 animales tratados y 10 testigos, y no es posible concluir que la sustancia estudiada sea sensibilizante, se recomienda con insistencia realizar ensayos complementarios con otros animales hasta completar un mínimo de 20 cobayas tratados y 10 cobayas testigos.

1.5.1.2.3. Dosis

La concentración de la sustancia utilizada para cada exposición de inducción debe tolerarse bien sistemáticamente y debe ser la más elevada que produzca irritación cutánea suave o moderada. La concentración utilizada para la exposición de provocación debe ser la mayor dosis no irritante. Si necesario, las concentraciones apropiadas pueden ser determinadas a partir de un estudio piloto en el que se utilicen dos a tres animales. Debe considerarse la posibilidad de utilizar con este fin animales tratados con FCA.

1.5.1.3. Procedimiento

1.5.1.3.1. Inducción

Día 0: lote tratado

Se administran tres pares de inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en la región dorsal superior, de la que se habrá eliminado el pelo, de forma que a cada lado de la línea media quede una inyección de cada par.

Inyección 1: mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico

Inyección 2: la sustancia de ensayo en un vehículo adecuado, en la concentración seleccionada

Inyección 3: la sustancia de ensayo en la concentración seleccionada formulada en una mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico

En la inyección 3, las sustancias hidrosolubles se disuelven en la fase acuosa antes de mezclarse con el FCA. Las sustancias liposolubles o insolubles se suspenden en la FCA antes de combinarse con la fase acuosa. La concentración final de la sustancia de ensayo será igual a la utilizada en la inyección 2.

Las inyecciones 1 y 2 se ponen próximas entre sí y lo más cerca posible de la cabeza, mientras que la inyección 3 se aplica hacia la parte caudal de la superficie de ensayo.

Día 0: lote testigo

Se ponen tres pares de inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en los mismos lugares que en los animales tratados.

Inyección 1: mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico

Inyección 2: vehículo solo

Inyección 3: formulación al 50 % (p/v) del vehículo en una mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico.

Días 5-7: lotes tratado y testigo

Aproximadamente 24 horas antes de la aplicación tópica de inducción, si la sustancia no es irritante de la piel, se trata la superficie de ensayo, previo corte al rape del pelo o afeitado del mismo, con 0,5 ml de lauril-sulfato sódico al 10 % en vaselina, a fin de producir irritación local.

Días 6-8: lote tratado

Se elimina de nuevo el pelo de la superficie de ensayo. Se carga totalmente un papel de filtro (2 x 4 cm) con la sustancia de ensayo en un vehículo adecuado, se aplica a la superficie de ensayo y se mantiene con un apósito oclusivo durante 48 horas. La elección del vehículo debe justificarse. Los productos sólidos se pulverizan finamente y se incorporan a un vehículo adecuado. Los líquidos pueden aplicarse sin diluir, en caso de que esto sea apropiado.

Días 6-8: lote testigo

Se elimina de nuevo el pelo de la superficie de ensayo. Sólo se aplica el vehículo, de forma similar, en la superficie de ensayo con un apósito oclusivo durante 48 horas.

1.5.1.3.2. Provocación

Días 20-22: lotes tratado y testigo

Se elimina el pelo de los costados de los animales tratados y de los testigos. Se aplica un parche o cámara con la sustancia estudiada sobre un costado de los animales y, cuando sea pertinente, también se puede aplicar en el otro costado un parche o cámara con el vehículo solo. Los parches se mantienen con un apósito oclusivo durante 24 horas.

1.5.1.3.3. Observación y clasificación: lotes tratado y testigo

- Aproximadamente a las 21 horas de levantar el parche, se limpia la superficie de ensayo y, en caso necesario, se elimina el pelo mediante corte al rape, afeitado o depilación.
- Unas 3 horas después (hacia las 48 horas del inicio de la aplicación de provocación) se observa la reacción cutánea y se registra de acuerdo con la clasificación que se recoge en el apéndice.
- Aproximadamente a las 24 horas de esta observación se hace una segunda observación (72 horas), que se registra igualmente.

Se recomienda la lectura ciega de los animales tratados y testigos.

En caso necesario para aclarar los resultados obtenidos con la primera provocación, debe considerarse la posibilidad de realizar, una semana después de esa primera provocación, una segunda (es decir, una «reprovocación»), cuando convenga con un nuevo lote testigo. La reprovocación también puede aplicarse al lote testigo original.

Deben observarse y registrarse, de acuerdo con la escala de Magnusson y Kligman (véase el apéndice) todas las reacciones cutáneas y cualquier observación extraña, incluidas las reacciones sistémicas, derivadas de los procesos de inducción y provocación. Para aclarar reacciones dudosas, pueden aplicarse otros procedimientos como, por ejemplo, examen histopatológico, medición del espesor del pliegue cutáneo, etc.

1.5.2. *Ensayo de Buehler*

1.5.2.1. Preparación

Durante al menos 5 días antes del inicio del ensayo, se aclimatan a las condiciones del laboratorio cobayas albinos jóvenes y sanos. Antes del ensayo, los animales se eligen al azar y se asignan a los lotes de tratamiento. La eliminación del pelo se hace por corte, afeitado, o incluso depilación química, en función del método de ensayo utilizado. Debe evitarse la producción, de escoriaciones en la piel. Los animales se pesarán antes del ensayo y al final del mismo.

1.5.2.2. Condiciones del ensayo

1.5.2.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan cepas corrientes de laboratorio de cobaya albino.

1.5.2.2.2. Número y sexo

Se pueden utilizar animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras, deben ser núlparas y no grávidas.

Se utilizan por lo menos 20 animales para el lote tratado y, por lo menos, 10 animales para el lote testigo.

1.5.2.2.3. Dosis

La concentración de sustancia de ensayo utilizada en cada exposición de inducción debe ser la más elevada posible que produzca una irritación suave pero no excesiva. La concentración utilizada para la exposición de provocación debe ser la mayor dosis no irritante. Si necesario, las concentraciones apropiadas pueden ser determinadas a partir de un estudio piloto en el que se utilicen dos o tres animales.

En caso de sustancias hidrosolubles, es conveniente utilizar agua o una solución diluida no irritante de un agente tensoactivo como vehículo. Para otros tipos de sustancias, se recomienda etanol/agua al 80 % para la inducción y acetona para la provocación.

1.5.2.3. Procedimiento

1.5.2.3.1. Inducción

Día 0: lote tratado

Se elimina el pelo de un costado (por corte al rape). El sistema del parche de ensayo debe cargarse totalmente con la sustancia en un vehículo adecuado (debe justificarse la elección del vehículo; las sustancias líquidas pueden aplicarse sin diluir, en caso de que sea conveniente). El sistema del parche de ensayo se aplica a la zona de ensayo y se mantiene en contacto con la piel mediante una cámara o parche oclusivo y un apósito adecuado durante 6 horas.

El sistema del parche de ensayo debe ser oclusivo. Es apropiado utilizar una compresa de algodón, que puede ser circular o cuadrada, con una superficie aproximada de 4 a 6 cm². Se recomienda sujetarlo utilizando unas bridas adecuadas para garantizar la oclusión. Si se utiliza un envoltorio, puede ser necesario proceder a exposiciones complementarias.

Día 0: lote testigo

Se elimina el pelo de un costado (por corte al rape). Se aplica el vehículo solo de forma similar a la utilizada con el lote tratado. El sistema del parche de ensayo se mantiene en contacto con la piel mediante un parche oclusivo o cámara y un apósito adecuado durante 6 horas. Si puede demostrarse que no es necesario dar placebo al lote testigo, puede omitirse dicho tratamiento.

Días 6-8 y 13-15: lotes tratado y testigo

Se realiza la misma aplicación que en el día 0 en la misma superficie de ensayo (desprovista de pelo en caso necesario) del mismo costado el día 6-8, y de nuevo el día 13-15.

1.5.2.3.2. Provocación

Días 27-29: lotes tratado y testigo

Se elimina el pelo (mediante corte al rape) del costado no tratado de los animales tratados y testigos. Se aplica un parche oclusivo o cámara con la cantidad conveniente de sustancia, a la concentración máxima no irritante, a la parte posterior del costado sin tratar de los animales tratados y testigos.

Cuando sea pertinente, también se aplicará un parche oclusivo o cámara con vehículo solo a la parte anterior del costado sin tratar de los animales tratados y testigos. Los parches o cámaras se mantienen con un apósito adecuado durante 6 horas.

1.5.2.3.3. Observación y clasificación

- Aproximadamente a las 21 horas de levantar el parche, se elimina el pelo de la superficie de provocación.
- Unas 3 horas después (hacia las 30 horas de la aplicación del parche de provocación) se observan las reacciones cutáneas y se registran de acuerdo con la clasificación recogida en el apéndice.
- Aproximadamente a las 24 horas después de la observación de las 30 horas (hacia las 54 horas de la aplicación del parche de provocación) se vuelven a observar y registrar las reacciones cutáneas.

Se recomienda la lectura ciega de los animales tratados y testigos.

En caso necesario para aclarar los resultados obtenidos en la primera provocación, puede considerarse la realización de una segunda provocación (es decir, una «reprovocación»), en su caso con un nuevo lote testigo, a la semana de haber realizado la primera. También puede realizarse una reprovocación con el lote testigo original.

Deben observarse y registrarse con arreglo a la escala de Magnusson y Kligman (véase el apéndice) todas las reacciones cutáneas y cualquier observación extraña, incluidas las reacciones sistémicas, derivadas de los procesos de inducción y provocación. Pueden llevarse a cabo otros procedimientos como, por ejemplo, el examen histopatológico o la medida del espesor de los pliegues cutáneos, a fin de aclarar reacciones dudosas.

2. RESULTADOS (GPMT Y ENSAYO DE BUEHLER)

Los resultados deben resumirse en un cuadro que indique las reacciones cutáneas de cada animal en cada observación.

3. **INFORME (GPMT Y ENSAYO DE BUEHLER)**

Si se realiza un ensayo de cribado, por ejemplo, ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA) o prueba de tumefacción de la oreja del ratón (MEST) antes del ensayo con cobayas, deberá darse una descripción o referencia del ensayo, con datos sobre el método, además de los resultados obtenidos con las sustancias estudiadas y de referencia.

Informe del ensayo (GPMT y ensayo de Buehler)

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

Animales de ensayo:

- cepa de cobaya utilizada
- número, edad y sexo de los animales
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- pesos de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

- técnica de preparación del lugar para el parche
- datos de los materiales y técnica de vendaje
- resultado del estudio piloto con sus conclusiones sobre las concentraciones de inducción y provocación que se deban utilizar en el ensayo
- datos de la preparación, aplicación y eliminación de la sustancia estudiada
- justificación de la elección del vehículo
- concentraciones del vehículo y de la sustancia estudiada utilizadas para las exposiciones de inducción y provocación, y cantidad total de sustancia aplicada para la inducción y la provocación.

Resultados:

- resumen de los resultados de la última comprobación realizada de la sensibilidad y fiabilidad (véase el punto 1.3), incluida la información sobre la sustancia, la concentración y el vehículo que se hayan utilizado
- datos de cada animal, incluido el sistema de clasificación
- descripción de la naturaleza y grado de los efectos observados
- las eventuales observaciones histopatológicas.

Discusión de los resultados

Conclusiones

4. **BIBLIOGRAFÍA**

El presente método es análogo a la TG 406 de la OCDE.

Apéndice

CUADRO:

**Escala de clasificación de Magnusson y Kligman para evaluar las reacciones del ensayo con
parche de provocación**

- 0 = sin cambios visibles
 - 1 = eritema ligero o en manchas localizadas
 - 2 = eritema moderado y confluyente
 - 3 = eritema intenso y tumefacción.
-

B.7. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) POR VÍA ORAL

1. MÉTODO

1.1 Introducción

Véase la introducción general de la Parte B.

1.2. Definiciones

Véase la introducción general de la Parte B.

1.3. Principio del método

La sustancia de ensayo se administra diariamente por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante un período de 28 días. A lo largo del período de administración, se observa a los animales todos los días atentamente con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

El presente método insiste más en los efectos neurológicos, como parámetro específico, y en la necesidad de hacer observaciones clínicas atentas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método sirve para detectar productos químicos con potencial neurotóxico, lo que puede justificar la realización de investigaciones más profundas de este aspecto. Además, el método puede proporcionar una indicación de los efectos inmunológicos y de la toxicidad sobre los órganos reproductores.

1.4. Descripción del método

1.4.1. Preparación

Se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en los lotes testigo y tratado. Las jaulas deben disponerse de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Los animales se identifican individualmente y se mantienen en sus jaulas durante al menos cinco días antes del inicio del ensayo, a fin de permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

La sustancia de ensayo se administra por sonda o con el alimento o el agua de bebida. El método de administración oral depende del objetivo del estudio y de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda que, siempre que sea posible, se considere en primer lugar el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una emulsión o solución oleosa (por ejemplo, aceite de maíz) y, a continuación, la posible disolución en otros vehículos. En caso de vehículos distintos del agua, deberán conocerse sus características tóxicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en el vehículo.

1.4.2. Condiciones del ensayo

1.4.2.1. Animales de laboratorio

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Hay que utilizar animales jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. La administración debe empezar lo antes posible tras el destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad.

Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales utilizados debe ser mínima y no superar el $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

Cuando se realice un estudio de la toxicidad oral con administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad a largo plazo, es preferible que se utilicen en ambos estudios animales procedentes de la misma cepa y del mismo origen.

1.4.2.2. Número y sexo

Deben utilizarse por los menos 10 animales (cinco hembras y cinco machos) para cada dosis. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio.

Además, puede tratarse un grupo satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con la dosis más elevada durante 28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (cinco de cada sexo).

1.4.2.3. Dosis

Deben utilizarse generalmente como mínimo tres lotes de ensayo y un lote testigo. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote testigo deben ser tratados de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia de ensayo, el lote testigo recibirá el mayor volumen utilizado de dicho vehículo. Si, a partir de la evaluación de otros datos, no cabe esperar ningún efecto con la dosis de 1 000 mg/kg peso corporal/día, puede realizarse un ensayo límite. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio de búsqueda de dosis.

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente y los datos cinéticos o toxicocinéticos disponibles en relación con la sustancia de ensayo o productos afines. La dosis elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos pero sin llegar a la muerte ni a un sufrimiento intenso. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis a fin de poner de manifiesto las posibles respuestas en función de la dosis; y la dosis mínima será la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 10) entre dosis.

En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante garantizar que las cantidades de la sustancia de ensayo utilizadas no interfieren con la nutrición normal ni con el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (en ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales; deberá indicarse qué alternativa se ha seguido. En el caso de una sustancia administrada por sonda, la dosis debe darse todos los días a una hora similar, y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal.

Cuando se utilice un estudio de administración continuada como fase previa de un estudio a largo plazo, deberá utilizarse en ambos estudios una dieta similar.

1.4.2.4. Ensayo límite

Si un ensayo con una sola dosis de, al menos, 1000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración con los alimentos o el agua de bebida, con una concentración equivalente en los alimentos o el agua de bebida (según las determinaciones del peso corporal), siguiendo los procedimientos descritos en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente afines, no debiera esperarse la aparición de toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es aplicable salvo cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.4.2.5. Período de observación

El período de observación debe ser de 28 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite previsto para las observaciones de seguimiento durante al menos otros 14 días sin tratamiento, a fin de detectar la aparición retardada o la persistencia o la recuperación de los efectos tóxicos.

1.4.3. Procedimiento

Las dosis de sustancia se administran a los animales todos y cada uno de los días del período de 28; es necesario justificar el uso eventual de una posología de sólo cinco días por semana.

Cuando la sustancia estudiada se administre por alimentación forzada, deberá hacerse con una sola dosis utilizando una sonda gástrica o una cánula adecuada de intubación. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen no debe pasar de 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de las soluciones

acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que muestren normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis.

1.4.3.1. Observaciones generales

Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registrará el estado sanitario de los animales. Al menos dos veces el día se observará la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Cuando se vean, se sacarán los animales moribundos y los que padezcan dolor o sufrimiento grave, se sacrificarán de forma compasiva y se someterán a necropsia.

Se someterán todos los animales a observación clínica detallada antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto) y al menos una vez por semana después. Estas observaciones deben hacerse fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y, de preferencia, siempre a la misma hora. Estas observaciones deben registrarse cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos explícitamente por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y que las observaciones sean realizadas de preferencia por observadores ajenos al tratamiento. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, respiración anómala). Deben registrarse también los cambios observados en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipos (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anómalos (por ejemplo, automutilación, marcha hacia atrás).

En la cuarta semana de exposición deben evaluarse la receptividad sensorial frente a estímulos de distintos tipos (por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos), la fuerza de prensión y la actividad motriz. En la bibliografía (véase la introducción general de la Parte B) se encuentran más datos sobre los procedimientos que pueden seguirse.

Las observaciones funcionales de la cuarta semana de exposición pueden omitirse cuando el estudio se realice como fase preliminar de un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica (de 90 días). En este caso, las observaciones funcionales deberán incluirse en este estudio de continuación. Por otra parte, la disponibilidad de datos sobre las observaciones funcionales en el estudio de administración continuada puede facilitar la selección de las dosis utilizadas en un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica.

De forma excepcional, las observaciones funcionales pueden omitirse también en lotes que muestren signos de toxicidad de otro tipo tales que interfieran significativamente con los resultados de las pruebas funcionales.

1.4.3.2. Peso corporal y consumo de alimento y agua

Al menos una vez por semana deben pesarse todos los animales y debe medirse el consumo de alimentos y agua. Si la sustancia estudiada se administra con el agua de bebida, deberá medirse también el consumo de agua al menos semanalmente.

1.4.3.3. Hematología

Los exámenes hematológicos siguientes deben practicarse al final del período de ensayo: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación de la sangre.

Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado, justo antes del sacrificio de los animales (o como parte del método de sacrificio), y conservarse en condiciones adecuadas.

1.4.3.4. Bioquímica clínica

Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes sobre los

tejidos y, especialmente, en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes de su sacrificio o como parte del método de sacrificio (aparte de los moribundos o sacrificados a lo largo del ensayo). Se recomienda que los animales estén en ayunas desde el día anterior antes de la toma de muestra (1). Los parámetros medidos del plasma o del suero incluirán las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albúminas, al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa, o sorbitol deshidrogenasa). La medida de otras enzimas (de origen hepático o no) y de ácidos biliares puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.

(1) El ayuno desde la víspera es preferible para ciertas medidas del suero y del plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal de esta preferencia es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y hacer más difícil la interpretación. Por otra parte, no obstante, el ayuno desde la víspera puede interferir con el metabolismo general de los animales y, especialmente en estudios de alimentación, puede alterar la exposición diaria a la sustancia estudiada. Si se adopta el ayuno desde la víspera, deben realizarse determinaciones bioquímicas clínicas después de la realización de las observaciones funcionales en la cuarta semana del estudio.

De forma opcional, pueden realizarse las siguientes determinaciones de orina en la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa y sangre o células sanguíneas.

Además, debe considerarse la realización de estudios para investigar marcadores séricos de lesiones tisulares generales. Otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas de la sustancia estudiada pueden afectar a las funciones metabólicas correspondientes incluyen las concentraciones de calcio, fosfato, triglicéridos en ayunas, hormonas específicas, metahemoglobina y colinesterasa. Se estudiará la necesidad de hacer estas determinaciones con las sustancias de determinadas clases o bien según cada caso. En general, es necesario aplicar un enfoque flexible, en función de las especies y los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

Si los datos de que se dispone sobre antecedentes no son adecuados, debe considerarse la determinación de variables hematológicas y bioquímicas antes de iniciar la administración de la sustancia.

1.4.3.5. Necropsia macroscópica

Se debe practicar una necropsia macroscópica completa y detallada a todos los animales utilizados en el estudio, incluyéndose aspectos como un examen atento de la superficie corporal externa, todos los orificios, y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimos, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales se limpiarán de los tejidos adherentes, según convenga, y se determinará su peso húmedo lo antes posible tras la disección, a fin de evitar su desecación.

Los tejidos que figuran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico posterior a que se vaya a someter: todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia anular), médula espinal, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, timo, tiroides, tráquea y pulmones (conservados mediante inflado con fijador, seguido de inmersión), gónadas, órganos sexuales secundarios (por ejemplo, útero, próstata), vejiga urinaria, ganglios linfáticos (preferiblemente un ganglio relacionado con la vía de administración y otro distante de la misma, para tener en cuenta los efectos sistémicos), nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, y una sección de la médula ósea (o bien puede optarse por médula ósea aspirada y recién montada). Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. También deben conservarse todos los

posibles órganos diana, según las propiedades conocidas de la sustancia estudiada.

1.4.3.6. Examen histopatológico

Hay que practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de todos los animales del lote expuesto a la dosis elevada y del lote testigo. Estos exámenes deben ampliarse a animales de todos los demás lotes tratados, en caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote de dosis elevada.

Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

Cuando se utilice un lote satélite, deberá hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los lotes tratados.

2. RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que muestre, respecto a cada lote, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales encontrados muertos durante la prueba o sacrificados por razones compasivas (y el momento de la muerte o sacrificio), el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de estos signos de toxicidad observados (con inclusión del momento de aparición, duración y gravedad de los efectos tóxicos), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales en los que se haya observado cada tipo de lesión.

Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y de amplia aceptación. Los métodos estadísticos deberán seleccionarse en la fase de diseño del estudio.

3. INFORME

Informe del ensayo

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

Animales de ensayo:

- especie y variedad utilizada
- número, edad y sexo de los animales
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- peso de cada animal al inicio del ensayo, a intervalos semanales después, y al final del ensayo

Condiciones del ensayo:

- justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua
- justificación de la selección de las dosis
- datos sobre la formulación de la sustancia estudiada o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado
- datos de la administración de la sustancia estudiada
- conversión de la concentración (ppm) de la sustancia estudiada en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), en su caso
- datos de la calidad de los alimentos y del agua

Resultados:

- peso corporal y cambios de peso corporal- consumo de alimentos y de agua, en su caso
- datos de respuestas tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas, (sean reversibles o no)
- evaluación de la actividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz
- pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia
- pruebas bioquímicas con los correspondientes valores de referencia
- peso corporal en el momento del sacrificio y datos sobre el peso de los órganos
- observaciones de la necropsia
- descripción pormenorizada de todas las observaciones histopatológicas
- datos sobre la absorción, si los hay
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. BIBLIOGRAFÍA

Este método es análogo a la TG 407 de la OCDE.

B.8. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) POR INHALACIÓN

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es útil disponer de información preliminar sobre la distribución de las partículas por tamaño, la presión de vapor, el punto de fusión, el punto de ebullición, el punto de inflamación y la capacidad explosiva (si procede) de la sustancia.

Véase también la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen varios grupos de animales, diariamente, durante un tiempo determinado, a la sustancia de ensayo en concentraciones distintas, utilizándose una sola concentración para cada lote, durante un período de 28 días. Cuando se utilice un vehículo para obtener una concentración adecuada de la sustancia en la atmósfera, se utilizará un lote testigo para el vehículo. Durante el período de administración se observa diariamente a los animales a fin de descubrir los síntomas de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueren durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento, por lo menos durante los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en lotes. Si es necesario, se puede añadir un vehículo apropiado a la sustancia de ensayo para obtener una concentración apropiada de ésta en la atmósfera. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar las dosis, éstos no deberán ser tóxicos. Pueden utilizarse datos ya publicados.

1.6.2. Condiciones de ensayo

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Salvo indicación contraria, la rata es la especie idónea. Hay que utilizar animales jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente.

Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales no debe exceder del ± 20 % del valor medio apropiado.

1.6.2.2. Número y sexo

Deben utilizarse diez animales (5 hembras y 5 machos) para cada lote experimental. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Si se van a sacrificar algunos animales durante el experimento, habrá que añadir la cantidad de animales que se haya previsto sacrificar. Además, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con la dosis más elevada durante

28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (5 de cada sexo).

1.6.2.3. Concentración de exposición

Son necesarias al menos tres concentraciones, así como un lote testigo y, en su caso, un lote testigo para el vehículo (la concentración del vehículo debe ser la del nivel de exposición más elevado). A excepción de la inhalación de la sustancia, los animales del grupo testigo deben ser tratados de la misma forma que los de los grupos experimentales. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen la muerte de ningún animal (o sólo de algunos). La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico detectable. Si se dispone una estimación aceptable sobre la exposición del hombre, la concentración más baja administrada debe ser superior a este valor. En condiciones ideales, la concentración intermedia debe producir unos efectos tóxicos observables mínimos. Si se utilizan varias concentraciones intermedias, la diferencia entre ellas debe ser suficiente para producir una gradación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a las concentraciones bajas e intermedias, así como en los lotes testigo, la mortalidad debe ser baja para que la evaluación de los resultados sea significativa.

1.6.2.4. Período de exposición

La exposición diaria debe ser de 6 horas, pero pueden resultar necesarios otros períodos de exposición para responder a algunas exigencias específicas.

1.6.2.5. Equipo

Los animales deben estar expuestos a la sustancia por medio de un dispositivo de inhalación que asegure un flujo continuo de aire de al menos 12 renovaciones por hora, garantizando un contenido en oxígeno apropiado y un reparto uniforme del producto de ensayo en el aire. Si se utiliza una cámara, debe estar concebida para impedir el amontonamiento de los animales y asegurar su exposición máxima, por inhalación de la sustancia de ensayo. Por regla general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de una cámara se debe procurar que el «volumen» total de animales de laboratorio no sobrepase el 5 % del volumen de la cámara de ensayo. También se puede recurrir a un sistema de exposición oro-nasal, únicamente de la cabeza o de cuerpo entero, en una cámara individual; con los dos primeros tipos de exposición se evita la absorción de la sustancia por otras vías.

1.6.2.6. Período de observación

Deberá observarse diariamente a los animales para descubrir los síntomas de toxicidad durante todo el período de tratamiento y de recuperación. Deberán registrarse el momento de la muerte y el momento en que aparecen y desaparecen los síntomas de toxicidad.

1.6.3. Procedimiento

Los animales están expuestos a la sustancia de ensayo diariamente entre 5 y 7 días por semana, durante un período de 28 días. Los animales de los grupos satélite destinados a observaciones complementarias deberán mantenerse en observación durante 14 días más, sin tratamiento, con el fin de descubrir la desaparición o la persistencia de los efectos tóxicos. La temperatura a la que se efectúa el ensayo debe ser de $22\text{ C} \pm 3\text{ C}$.

En condiciones ideales, la humedad relativa debe mantenerse entre el 30 y el 70 %, pero, en algunos casos, esto puede resultar imposible (por ejemplo, ensayos con aerosoles). Se puede evitar la pérdida de sustancia por dispersión a la zona circundante manteniendo una ligera presión negativa ($\leq 5\text{ mm}$ de agua) dentro de la cámara. Durante la exposición los animales no deben recibir alimento ni agua.

Es conveniente utilizar un sistema de inhalación que funcione en condiciones dinámicas provisto

de un dispositivo adecuado para el control analítico de la concentración. Para determinar las concentraciones de exposición adecuadas, se recomienda proceder a un ensayo preliminar. El caudal deberá ajustarse de manera que las concentraciones sean homogéneas en toda la cámara. El sistema debe permitir obtener lo más rápidamente posible unas condiciones de exposición estables.

Se debe medir o controlar:

(a) el caudal de aire (permanentemente);

(b) la concentración real de la sustancia de ensayo, medida en la zona de respiración. Durante el período de exposición diaria la concentración no debe variar en más de $\pm 15\%$ respecto del valor medio. Sin embargo, en el caso de algunos aerosoles, es difícil alcanzar este grado de control, aceptándose en dichos casos una diferencia mayor. Durante todo el ensayo hay que mantener las concentraciones diarias lo más constantes posible. En el caso de los aerosoles, se hará al menos un análisis semanal del tamaño de las partículas en cada lote de ensayo;

(c) temperatura y humedad, permanentemente si es posible.

Las observaciones tienen lugar durante y después de la exposición y se registran sistemáticamente; deben conservarse individualmente los datos de cada animal. Deben observarse diariamente todos los animales y registrar los síntomas de toxicidad, así como el momento de su aparición, su intensidad y su duración. La observación incluirá las modificaciones del pelo y la piel, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. El peso de los animales debe determinarse cada semana. Se recomienda igualmente medir el consumo alimentario cada semana. Es necesario observar regularmente a los animales para procurar que no se pierdan en el ensayo por razones como el canibalismo, autólisis de los tejidos o error de emplazamiento. Al final del ensayo se practicará la autopsia a todos los animales supervivientes de los lotes tratados no satélites. Los animales moribundos y los que muestren angustia o dolor graves deberán ser retirados inmediatamente, se sacrificarán de forma humanitaria y se les practicará la autopsia.

Los exámenes que figuran a continuación se efectuarán en todos los animales (incluidos los testigos) al terminar el ensayo:

(i) análisis hematológico que incluya al menos el hematocrito, la concentración de hemoglobina, el recuento de hematíes y leucocitos, la fórmula leucocitaria, así como un estudio de la coagulación;

(ii) determinaciones bioquímicas clínicas de la sangre incluyendo al menos un parámetro sobre las funciones hepática y renal: alanina aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de glutamato-piruvato-transaminasa) y aspartato aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de glutamato-oxalacetato-transaminasa) del suero, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada incluyen el calcio, el fósforo, los cloruros, el sodio, el potasio, la glucosa en ayunas, los lípidos, las hormonas, el equilibrio ácido-básico, la metahemoglobina y la actividad colinesterásica.

Si es necesario pueden realizarse otros análisis bioquímicos para profundizar el estudio de los efectos tóxicos observados.

1.6.3.1. Autopsia general

Se deberá practicar una autopsia general completa a todos los animales del ensayo. Al menos el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, los pulmones y los testículos se deben pesar húmedos, lo más rápidamente posible después de la disección para evitar que se sequen. Los órganos y tejidos deben conservarse en un medio apropiado para que puedan realizarse exámenes histopatológicos posteriores: las vías respiratorias, el hígado, los riñones, el bazo, los testículos, las glándulas suprarrenales y el corazón, así como todos los órganos que presenten lesiones macroscópicas o modificaciones volumétricas. Los pulmones deben extraerse enteros, pesarse y

tratarse con un fijador adecuado para conservar la estructura pulmonar.

1.6.3.2. Examen histopatológico

Hay que practicar un examen histopatológico de los órganos y tejidos conservados del lote expuesto a la concentración más alta y del lote o lotes testigo. Los órganos y los tejidos que presenten lesiones atribuibles a la sustancia de ensayo en la concentración más elevada deben ser examinados en todos los grupos que hayan estado expuestos a concentraciones más bajas. Deberá someterse a un examen histopatológico a los animales de todos los grupos satélite, centrado especialmente en los órganos y tejidos en los que se hayan comprobado lesiones en los otros lotes tratados.

2. RESULTADOS

Los resultados deben inventariarse en una tabla que indique, para cada lote de ensayo, el número de animales al comienzo del ensayo y el número de animales en los que se haya observado cada tipo de lesión.

Todos los resultados observados deben evaluarse por medio de un método estadístico adecuado. Puede utilizarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.,
- condiciones de ensayo:

Hay que describir el aparato de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema generador de aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire de salida y, en su caso, método de alojamiento de los animales en la cámara de ensayo. Debe describirse el equipo utilizado para medir la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosoles o la granulometría.

Datos relativos a la exposición:

Deben presentarse en forma de tabla, indicando los valores medios y una medida de la variabilidad (por ejemplo, desviación típica); deben incluir, en la medida de lo posible:

- a) caudales de aire a través del dispositivo de inhalación,
 - b) temperatura y humedad del aire,
 - c) concentraciones nominales (cantidad total de sustancia de ensayo introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen del aire),
 - d) en su caso, naturaleza del vehículo,
 - e) concentraciones reales en la zona de respiración,
 - f) diámetro aerodinámico de la mediana de la masa (DAMM) y desviación geométrica típica (DGT),
- respuesta tóxica por sexo y concentración,
 - momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido a la misma,
 - descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo; nivel que no causa ningún efecto,
 - momento de observación de cualquier síntoma anormal y evolución del mismo,
 - cantidades de alimento y peso corporal,
 - análisis hematológicos practicados y resultados de éstos,
 - pruebas bioquímicas clínicas practicadas y resultados de éstas,
 - resultados de la autopsia,
 - descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,
 - tratamiento estadístico de los resultados, si es posible,

- discusión de los resultados,
- interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.9. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) VÍA CUTÁNEA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La sustancia de ensayo se aplica diariamente por vía cutánea en dosis distintas a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis para cada lote, durante un período de 28 días. Durante el período de aplicación se observa diariamente a los animales a fin de descubrir los síntomas de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueren durante el ensayo así como a los que sobreviven al final del mismo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento, por lo menos, durante los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en lotes tratados y lotes testigo. Poco tiempo antes del ensayo se esquila la piel de la región dorsal de los animales. Se puede recurrir al rasurado, pero, en este caso, debe efectuarse unas 24 horas antes del ensayo. Suele ser necesario repetir el esquila o el rasurado aproximadamente cada semana. Durante el esquila o el rasurado hay que procurar no causar lesiones en la piel. La superficie que hay que despejar para aplicar la sustancia de ensayo no debe ser inferior al 10 % de la superficie corporal. Debe tenerse en cuenta el peso del animal para decidir la zona que hay que despejar y las dimensiones de la superficie que se va a tratar. Cuando la sustancia sea sólida (que, si es preciso, puede pulverizarse), deberá humedecerse con agua o, en su caso, con un vehículo apropiado, de forma que se asegure un buen contacto con la piel. Las sustancias líquidas se utilizan generalmente sin diluir. Se procede a una aplicación diaria, entre 5 y 7 días por semana.

1.6.2. Condiciones de ensayo

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Pueden utilizarse ratas, conejos o cobayas adultos. Se pueden utilizar también otras especies pero, en este caso, se habrá de justificar su utilización.

Al principio del ensayo la diferencia de peso entre los animales no debe exceder del ± 20 % del valor medio adecuado.

1.6.2.2. Número y sexo

Deben utilizarse al menos diez animales (5 hembras y 5 machos) de piel sana, para cada dosis. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Si se van a sacrificar algunos animales durante el

ensayo habrá que añadir la cantidad de animales que se haya previsto sacrificar. Además, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con el nivel de dosis más elevado durante 28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (5 de cada sexo).

1.6.2.3. Dosis

Se utilizan al menos tres dosis, así como un lote testigo y, en su caso, un lote testigo para el vehículo. El período mínimo de exposición será de 6 horas diarias.

La sustancia de ensayo debe aplicarse todos los días a la misma hora y las dosis deben adaptarse semanalmente o bisemanalmente con objeto de conservar un nivel de dosis constante respecto al peso corporal de los animales. A excepción de la administración de las sustancias de ensayo, debe tratarse a los animales del lote testigo de la misma forma que a los de los lotes experimentales. Cuando para facilitar la administración se utilice un vehículo, éste se administrará también al lote testigo, del vehículo en las mismas condiciones que a los lotes tratados; la dosis será la misma que se administre al grupo tratado con la dosis más elevada. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen la muerte de ningún animal (o sólo de algunos). La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico detectable. Si se dispone de una estimación aceptable sobre la exposición del hombre, la dosis más baja administrada debe superar este valor. En condiciones óptimas la dosis intermedia debe producir unos efectos tóxicos observables mínimos. Si se utilizan varias dosis intermedias, la diferencia entre ellas debe ser suficiente para producir una graduación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a dosis bajas o intermedias, así como en los lotes testigo, la mortalidad debe ser baja para que la evaluación de los resultados sea significativa.

Si la aplicación de la sustancia de ensayo provoca una irritación cutánea grave, deben reducirse las concentraciones; esto puede producir una disminución, incluso una desaparición, de otros efectos tóxicos en las dosis más elevadas. Si las lesiones cutáneas son muy graves, puede resultar necesario detener el experimento y comenzar de nuevo con concentraciones más bajas.

1.6.2.4. Prueba límite

Si en un experimento preliminar realizado con una dosis de 1 000 mg/kg, o con una dosis más elevada en función de una posible exposición humana (si se conoce), no se ha observado ningún efecto tóxico, puede ser innecesario continuar el experimento.

1.6.2.5. Período de observación

Se deben observar todos los animales diariamente con el fin de descubrir los síntomas de toxicidad. Debe registrarse el momento de la muerte, así como el momento en que aparecen y desaparecen los síntomas de toxicidad.

1.6.3. Procedimiento

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. En condiciones óptimas, la sustancia se administra a los animales todos los días, durante un período de 28 días. Los animales de todos los grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben mantenerse en observación 14 días más, sin tratamiento, para comprobar la curación o la persistencia de los efectos tóxicos. La duración mínima de la exposición debe ser de 6 horas diarias. La sustancia debe aplicarse uniformemente sobre una superficie equivalente más o menos al 10 % de la superficie total corporal. Cuando se trata de sustancias altamente tóxicas, la superficie cubierta puede ser menor, pero procurando que al aplicar la sustancia se forme en toda la superficie una capa lo más fina y uniforme posible.

Durante la exposición, la sustancia se mantiene en contacto con la piel mediante un apósito de gasa porosa y un esparadrapo no irritante. Además, la superficie tratada debe estar

convenientemente cubierta para mantener en su sitio el apósito de gasa y la sustancia e impedir que los animales puedan ingerir esta última. Pueden utilizarse aparatos de contención para impedir la ingestión de la sustancia, pero no se recomienda una inmovilización completa. Puede usarse un dispositivo protector en forma de collar como método alternativo.

Al término del período de exposición, hay que eliminar cualquier residuo de sustancia, a ser posible, con agua, o con cualquier otro procedimiento adecuado de limpieza de la piel.

Deben observarse todos los animales diariamente y registrar los síntomas de toxicidad, así como el momento de su aparición, su intensidad y su duración. La observación incluirá las modificaciones del pelo y la piel, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Semanalmente deben determinarse los pesos de los animales y se recomienda igualmente medir el consumo alimentario cada semana. Es necesario observar regularmente a los animales para procurar que no se pierdan en el experimento por razones como el canibalismo, autólisis de los tejidos o error de emplazamiento. Al término de la experiencia se practica la autopsia a todos los animales supervivientes de los lotes tratados no satélites. Los animales moribundos y los que presenten angustia o dolor graves se retirarán inmediatamente, se sacrificarán de forma humanitaria y se les practicará la autopsia.

Al terminar el ensayo se efectuarán los siguientes análisis en todos los animales (incluidos los del lote testigo):

1. análisis hematológico que incluya al menos el hematocrito, la concentración de hemoglobina, el recuento de hematíes y leucocitos, la fórmula leucocitaria, así como un estudio de la coagulación;

2. determinaciones bioquímicas clínicas de la sangre incluyendo al menos un parámetro sobre las funciones hepáticas y renal: alanina-aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de glutamato-piruvato-transaminasa) y aspartato aminotransferasa (antiguamente conocido con el nombre de glutamato-oxalacetato-transaminasa) del suero, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada incluyen el calcio, fósforo, cloruros, sodio, potasio, glucosa en ayunas, lípidos, hormonas, el equilibrio ácido-básico, metahemoglobina y la actividad colinesterásica.

Si es necesario, pueden realizarse otros análisis bioquímicos para profundizar el estudio de los efectos tóxicos observados.

1.6.4. Autopsia general

Se practicará una autopsia general completa a todos los animales sometidos al ensayo. Al menos el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales y los testículos se deben pesar húmedos, lo más rápidamente posible después de la disección, para evitar que se sequen. Los órganos y tejidos, es decir, la piel normal y tratada, el hígado, los riñones, el bazo, los testículos, las glándulas suprarrenales, el corazón y los órganos diana (es decir los que presentan lesiones importantes o modificaciones volumétricas) deben conservarse en un medio apropiado para que puedan realizarse exámenes histopatológicos posteriores.

1.6.5. Examen histopatológico

Hay que practicar un examen histopatológico de los órganos y tejidos que se conserven del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote testigo. Los órganos y los tejidos que presenten lesiones inducidas por la sustancia de ensayo en el nivel de dosis más elevado, deben examinarse en todos los lotes que hayan estado expuestos a dosis más bajas. Los animales del lote satélite deberán someterse a un examen histológico, centrado especialmente en los órganos y tejidos en los que se hayan comprobado lesiones en los demás lotes tratados.

2. RESULTADOS

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote de ensayo, el número de animales al comienzo del ensayo y el número de animales en los que se haya observado cada tipo de lesión.

Todos los resultados observados deben evaluarse por medio de un método estadístico adecuado. Puede utilizarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

- datos relativos a los animales (especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.),
- condiciones de ensayo, (incluido el tipo de apósito: oclusivo o no oclusivo),
- dosis (en su caso, también el vehículo) y concentraciones,
- nivel que no produce ningún efecto, si es posible,
- respuesta tóxica por sexo y dosis,
- momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido,
- efectos tóxicos u otros,
- momento de observación de cualquier síntoma anormal y su evolución,
- cantidades de alimento y peso corporal,
- análisis hematológicos practicados y resultados,
- pruebas bioquímicas clínicas practicadas y resultados,
- resultados de la autopsia,
- descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,
- tratamiento estadístico de los resultados, si es posible,
- discusión de los resultados,
- interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B. 10. MUTAGENICIDAD – ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS *IN VITRO*

EN MAMÍFEROS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 473 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* en mamíferos (1997).

1.1 INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* tiene por objeto detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo (1)(2)(3). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. Un aumento de la poliploidía puede indicar que una sustancia química es capaz de inducir aberraciones numéricas. No obstante, el presente método no está pensado para medir aberraciones de ese tipo ni se emplea habitualmente con ese fin. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados que provocan alteraciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores de las células somáticas intervienen en la inducción de cánceres en los seres humanos y los animales de experimentación.

En el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* pueden emplearse cultivos de líneas celulares establecidas, estirpes celulares o cultivos de células primarias. Las células deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo, la estabilidad cariotípica, el número y la diversidad cromosómica y la frecuencia de las aberraciones cromosómicas espontáneas.

En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien éste no puede reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Deben evitarse las circunstancias que puedan conducir a resultados positivos que no reflejen la mutagenicidad intrínseca sino que se deban a cambios en el pH, la osmolalidad o altos grados de citotoxicidad (4)(5).

El ensayo se emplea para detectar las posibles sustancias mutágenas o carcinógenas para los mamíferos. Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo son carcinógenos para los mamíferos, no hay una correlación absoluta entre los resultados del mismo y la carcinogenicidad. La correlación depende de la clase química. Además de ello, cada vez hay más pruebas de que existen carcinógenos que el ensayo no detecta, pues, al parecer, éstos actúan por mecanismos distintos de la lesión directa del ADN.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2 DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o en la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Endorreduplicación: proceso en el que, en lugar de entrar en mitosis tras la fase S de replicación del ADN, el núcleo inicia otra fase S, lo cual da lugar a cromosomas con 4, 8, 16, etc. cromátidas.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Índice mitótico: proporción entre el número de células en metafase y el número total de células de una población celular; indica el grado de proliferación de dicha población.

Aberración numérica: un cambio en el número de cromosomas a partir del número normal propio de las células empleadas.

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide (n) superior al diploide ($3n$, $4n$, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones y fragmentos, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los cultivos celulares a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, tras lo cual se tratan a intervalos preestablecidos con una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se recolectan las células, se tiñen y se observan al microscopio aquellas que se encuentren en la metafase con el fin de detectar la presencia de aberraciones cromosómicas.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Preparación

1.4.1.1 Células

Pueden emplearse líneas celulares, estirpes o cultivos de células primarias, incluidas las células humanas (fibroblastos de hámster chino, linfocitos de la sangre periférica, humanos o de otros mamíferos, etc.).

1.4.1.2 Medios y condiciones de cultivo

Para mantener los cultivos se emplean medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (recipientes de cultivo, concentración de CO₂, temperatura y humedad). En el caso de las líneas celulares establecidas y las estirpes, se comprobará regularmente la estabilidad del número cromosómico modal y la ausencia de contaminación por micoplasma. Se desecharán los cultivos contaminados. Debe conocerse la duración del ciclo celular normal de las células empleadas en esas condiciones de cultivo.

1.4.1.3 *Preparación de los cultivos*

Líneas celulares establecidas y estirpes: las células se obtienen de cultivos madre, se siembran en un medio de cultivo a una densidad a la cual los cultivos no confluyan antes del momento de la recolección y se incuban a 37°C.

Linfocitos: se añade sangre completa tratada con un anticoagulante (por ejemplo, heparina), o bien linfocitos aislados procedentes de sujetos sanos, a un medio de cultivo que contenga un mitógeno (por ejemplo, fitohemaglutinina) y se incuba a 37°C.

1.4.1.4 *Activación metabólica*

Las células deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (6)(7)(8)(9) o una mezcla de fenobarbital y β -naftoflavona (10)(11)(12).

La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 1 al 10% v/v en el medio de ensayo final. La elección del sistema de activación metabólica puede depender de la clase química de la sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial.

Son varias las técnicas -como la producción mediante ingeniería genética de líneas celulares que expresen enzimas activadoras específicas- que pueden proporcionar el potencial de activación endógena. La elección de las líneas celulares debe justificarse científicamente (ej. por la importancia de la isoenzima del citocromo P450 para el metabolismo de la sustancia de ensayo, etc.).

1.4.1.5 *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las células. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2 **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1 *Disolvente o vehículo*

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las células y la actividad de la S9. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua. Ésta podrá eliminarse añadiendo un tamiz molecular.

1.4.2.2 *Concentraciones de exposición*

Para determinar la mayor concentración de exposición deben considerarse al menos los siguientes criterios: citotoxicidad, solubilidad en el sistema de ensayo y variaciones del pH o la osmolalidad.

La citotoxicidad se determinará con y sin activación metabólica en el experimento principal mediante un indicador adecuado de la integridad y el crecimiento celular, como el grado de confluencia, el recuento de células viables o el índice mitótico. Puede ser útil determinar la citotoxicidad y la solubilidad en un experimento preliminar.

Se emplearán al menos tres concentraciones analizables. Si se produce citotoxicidad, la gama de concentraciones deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula, lo cual suele significar que la separación entre concentraciones corresponde a un factor comprendido entre 2 y $\sqrt{10}$. En el momento de la recolección, con la concentración mayor debe producirse una reducción considerable del grado de confluencia, el recuento celular o el índice mitótico (en todos los casos superior al 50 %). El índice mitótico sólo constituye una medida indirecta de los efectos citotóxicos o citostáticos y está relacionado con el tiempo transcurrido desde el tratamiento. No obstante, cabe utilizar dicho índice para los cultivos en suspensión en los cuales las demás mediciones de toxicidad pueden resultar engorrosas y poco prácticas. Los datos relativos a la cinética del ciclo celular como el tiempo medio de generación (TMG) pueden servir de información adicional. Sin embargo, el TMG es una media general que no siempre refleja la existencia de subpoblaciones que presentan retraso. Además de ello, incluso un ligero aumento del tiempo medio de generación puede asociarse a un retraso muy importante en el tiempo de mayor producción de aberraciones.

En el caso de sustancias escasamente citotóxicas, la concentración máxima de ensayo será la menor de estas tres: 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml ó 0,01 M.

En el caso de sustancias escasamente solubles que no resultan tóxicas a concentraciones inferiores al límite de solubilidad, la mayor dosis empleada deberá corresponder a una concentración superior a dicho límite en el medio de cultivo final al terminar el período de tratamiento. En algunos casos (por ejemplo, cuando se produce toxicidad únicamente con concentraciones superiores a la concentración mínima de insolubilidad), es aconsejable hacer pruebas con varias concentraciones con precipitación visible. Puede ser útil determinar la solubilidad al principio y al final del tratamiento, pues ésta puede variar durante la exposición en el sistema de ensayo debido a la presencia de células, S9, suero, etc. La insolubilidad puede detectarse por simple observación. El precipitado no debe interferir en la evaluación del resultado.

1.4.2.3 *Controles positivos y negativos*

En todos los experimentos deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo, con y sin activación metabólica. Cuando se aplique ésta, la sustancia del control positivo ha de requerir activación para provocar una respuesta mutagénica.

En los controles positivos debe emplearse un clastógeno conocido con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento reproducible y detectable respecto a la frecuencia espontánea, que ponga de manifiesto la sensibilidad del sistema de ensayo.

Las concentraciones del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Activación metabólica	Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Ausencia de activación metabólica exógena	Metanosulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
	Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
	N-óxido de 4-nitroquinolina-	56-57-5	200-281-1
Presencia de activación metabólica exógena	Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
	Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. Deberá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Se realizarán, para cada período de recolección, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo en el medio de tratamiento, y se tratarán de igual manera que los cultivos del ensayo. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior sobre controles que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.4.3 Procedimiento

1.4.3.1 *Tratamiento con la sustancia de ensayo*

Las células en crecimiento se tratan con la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. Los linfocitos deben empezar a tratarse unas 48 horas después de la estimulación mitogénica.

1.4.3.2 Como norma, deben prepararse dos cultivos para cada concentración y se recomienda seriamente hacer lo propio en el caso de los controles negativos o el disolvente. Si se demuestra, sobre la base de datos anteriores, que la diferencia entre los dos cultivos es mínima (13)(14), puede bastar un solo cultivo para cada concentración.

Las sustancias gaseosas o volátiles han de someterse a ensayo con métodos adecuados (recipientes de cultivo herméticos, etc.) (15)(16).

1.4.3.3 *Recolección de las células*

En el primer experimento se exponen las células a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, durante 3 a 6 horas. Se toma una muestra transcurrido un período, desde el inicio del tratamiento, de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (12). Si este protocolo da resultados negativos con y sin activación, debe efectuarse otro experimento sin activación, pero con tratamiento continuo hasta que se tome la muestra tras un período de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal. Algunas sustancias químicas se detectan mejor con un tiempo de tratamiento y toma de muestra superior a dicho período. La obtención de resultados negativos en presencia de activación metabólica debe confirmarse caso por caso. Si dicha confirmación no se considera necesaria, debe justificarse.

1.4.3.4 *Preparación de los cromosomas*

Se tratan los cultivos celulares con Colcemid® o colchicina por lo general durante un período de 1 a 3 horas antes de la recolección. Los cultivos celulares se recolectan y procesan por separado para preparar los cromosomas. Dicha preparación incluye el tratamiento hipotónico de las células, la fijación y la tinción.

1.4.3.5 *Análisis*

Antes de analizarlas al microscopio, se asignará un código independiente a cada preparación, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de fijación provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, todos los tipos de células analizadas deben contener un número de centrómeros igual al número modal ± 2 . Deben analizarse al menos 200 metafases bien distribuidas en cada concentración y control y, en su caso, repartidas de forma equilibrada entre los cultivos dobles. La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones.

Pese a que el objeto del ensayo consiste en detectar aberraciones cromosómicas estructurales, es importante registrar los posibles casos de poliploidía y endorreduplicación.

2. **RESULTADOS**

2.1 **TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS**

Dado que la unidad experimental es la célula, se evaluará el porcentaje de éstas que presenta aberraciones cromosómicas estructurales. Se hará una relación de los distintos tipos, el número y la frecuencia de dichas aberraciones en los cultivos experimentales y los controles. Los gaps se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones.

Asimismo, se registrarán las determinaciones de citotoxicidad realizadas en paralelo en todos los cultivos tratados y los controles negativos de los principales experimentos sobre aberraciones.

Se proporcionarán los datos relativos a cada cultivo y se resumirán en forma de tabla.

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. En el apartado 1.4.3.3. se trata la pertinencia de confirmar los resultados negativos. En los experimentos ulteriores se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentra la separación entre concentraciones y las condiciones de activación metabólica.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración o aumento reproducible del número de células que presentan aberraciones cromosómicas, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (3)(13). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

El aumento del número de células poliploides puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir procesos mitóticos y de producir aberraciones cromosómicas numéricas. El aumento del número de células con cromosomas endorreduplicados puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir la progresión del ciclo celular (17)(18).

No se considerarán mutágenas en el sistema de ensayo las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas estructurales en los cultivos de células somáticas de mamífero. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en los cultivos de células somáticas de mamífero.

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo;
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Células:

- tipo y procedencia;
- características del cariotipo e idoneidad del tipo de células empleadas;
- ausencia de micoplasma, si procede;
- información sobre la duración del ciclo celular;
- sexo de los donantes de sangre, sangre completa o linfocitos aislados y mitógeno empleado;
- número de pases, si procede;
- métodos de mantenimiento del cultivo celular, si procede;
- número modal de cromosomas.

Condiciones del ensayo:

- sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración de la exposición de las células;
- fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos (datos relativos a la citotoxicidad, límites de solubilidad, si se conocen, etc.);
- composición del medio, concentración de CO₂, si procede;
- concentración de la sustancia de ensayo;
- volumen de vehículo y de sustancia de ensayo añadida;
- temperatura de incubación;
- tiempo de incubación;
- duración del tratamiento;
- densidad celular en el momento de la siembra, si procede;
- tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad;
- controles positivos y negativos;
- métodos de preparación de los portaobjetos;
- criterios de recuento de las aberraciones;
- número de metafases analizadas;
- métodos de determinación de la toxicidad;
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o ambiguos.

Resultados:

- signos de toxicidad (grado de confluencia, datos del ciclo celular, recuentos celulares, índice mitótico, etc.);
- signos de precipitación;
- datos sobre el pH y la osmolalidad del medio de tratamiento, si se han determinado;
- definición de las aberraciones, incluidos los gaps;
- número de células que presentan aberraciones cromosómicas e indicación por separado del tipo de dichas aberraciones en cada cultivo tratado y cada control;
- variaciones de la ploidía, en su caso;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos, si se han realizado;
- datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo;
- datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. En Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.) Plenum Press, New York y London, pp. 1-29.
2. Ishidate, M.Jr. y Sofuni, T. (1985). The *in Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. En: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427-432.
3. Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. y Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (supl.10), 1-175.
4. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. y Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
5. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. y Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.

6. Ames, B.N., McCann, J. y Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
7. Maron, D.M. y Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
8. Natarajan, A.T., Bates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. y de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
9. Matsuoka, A., Hayashi, M. y Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66, 277-290.
10. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. y Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
11. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. y Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. En: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. y Philpot, R.M. (eds.) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
12. Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, 241-261.
13. Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. y Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. En: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
14. Soper, K.A. y Galloway, S.M. (1994). Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, 139-149.
15. Krahn, D.F., Barsky, F.C. y McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. En: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.
16. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. y Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
17. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.
18. Huang, Y., Change, C. y Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

B.11. MUTAGENICIDAD – ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS *IN VIVO*

EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 475 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea de mamíferos (1997).

1.1 INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo* en mamíferos se realiza para detectar aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por la sustancia de ensayo en células de médula ósea de animales -por lo general roedores- (1)(2)(3)(4). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. Un aumento de la poliploidía puede indicar que una sustancia química es capaz de inducir aberraciones numéricas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados que provocan alteraciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores guardan relación con el cáncer en los seres humanos y los sistemas experimentales.

En este ensayo se utilizan habitualmente roedores. El tejido diana es la médula ósea por estar muy vascularizada y por contener una población de células de ciclo corto que pueden aislarse y tratarse con facilidad. En el presente método no se consideran otras especies ni otros tejidos diana.

El presente ensayo de aberraciones cromosómicas está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, pues permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie y el tejido. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2 DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Endorreduplicación: proceso en el que, después de una fase S de replicación del ADN, el núcleo entra en mitosis para iniciar otra fase S, lo cual da lugar a cromosomas con 4, 8, 16, etc. cromátidas.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Aberración numérica: número de cromosomas distinto del número normal propio de las células empleadas.

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide (n) superior al diploide ($3n$, $4n$, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones y fragmentos, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada y se sacrifican a intervalos apropiados tras el tratamiento. Antes de sacrificarlos, se les administra una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o Colcemid®). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células de médula ósea y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromosómicas.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Preparación

1.4.1.1 Selección de la especie animal

Si bien suelen emplearse la rata, el ratón y el hámster chino, puede utilizarse otra especie de mamíferos apropiada. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2 Alojamiento y alimentación de los animales

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60 %.

1.4.1.3 Preparación de los animales

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días.

1.4.1.4 Preparación de las dosis

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestran que es posible conservarlas.

1.4.2 Condiciones del ensayo

1.4.2.1 Disolvente o vehículo

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2 Controles

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en ambos sexos y en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían producirse aberraciones estructurales *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia empleada en el control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con aberraciones cromosómicas aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Si se hace una sola toma de muestras en los controles negativos, el momento más oportuno para hacerla es tras el primer período de muestreo. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 **Número y sexo de los animales**

Los lotes tratados y los controles han de estar compuestos al menos por cinco hembras y cinco machos analizables cada uno. Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo. En caso de que la exposición humana a sustancias químicas pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2 **Pauta de tratamiento**

Las sustancias de ensayo se administran preferiblemente en una sola vez, aunque también puede dividirse la dosis -por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo- con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades. Si se siguen otras pautas debe justificarse científicamente.

Se toman dos muestras en momentos distintos tras el tratamiento administrado en un día. En el caso de los roedores, la primera muestra se toma transcurrido un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (éste suele durar de 12 a 18 horas) desde el tratamiento. Dado que el tiempo necesario para que la sustancia de ensayo se asimile y se metabolice, así como el efecto de ésta sobre la cinética del ciclo celular pueden modificar el momento óptimo para detectar aberraciones cromosómicas, se recomienda tomar otra muestra 24 horas después de la primera. Si se siguen pautas de más de un día, ha de tomarse una muestra transcurrido un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular normal desde la última administración.

Antes de sacrificar los animales, se les inyecta por vía intraperitoneal una dosis adecuada de una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se extraen las muestras transcurrido un plazo oportuno, que en el caso de los ratones es de unas 3 a 5 horas y en el de los hámsters chinos, de unas 4 a 5 horas. Se toman las células de la médula ósea y se analizan en busca de aberraciones cromosómicas.

1.5.3 **Dosis**

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal (5). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el período de muestreo posterior se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por dosis máxima la que produzca tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo resultaría probablemente letal. Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en la médula ósea (por ejemplo, reducción del índice mitótico superior al 50 %).

1.5.4 **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. En el caso de estudios de mayor duración, la dosis límite será de 2000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure hasta 14 días y de 1000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure más de 14 días. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5 **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a éste. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6 **Preparación de los cromosomas**

Se extrae la médula ósea inmediatamente después del sacrificio, se trata con una solución hipotónica y se fija. A continuación, se extienden las células en portaobjetos y se tiñen.

1.5.7 **Análisis**

Se evalúa la citotoxicidad determinando el índice mitótico en un mínimo de 1000 células por animal, en todos los animales tratados (incluidos los controles positivos) y en los controles negativos sin tratar.

Deben analizarse al menos 100 células de cada animal. La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones. Antes de analizarlas al microscopio, se asigna un código independiente a cada portaobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de preparación de los portaobjetos provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, las células analizadas deben contener un número de centrómeros igual a $2n \pm 2$.

2. **RESULTADOS**

2.1 **TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS**

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Se determinará en cada animal la cantidad de células analizadas, el número de aberraciones por célula y el porcentaje de células que presentan aberraciones cromosómicas estructurales. Se hará una relación de los distintos tipos, el número y la frecuencia de dichas aberraciones en los lotes tratados y los controles. Los gaps se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones. Si no se observan diferencias en la respuesta de un sexo y otro, los datos relativos a ambos sexos pueden considerarse conjuntamente en el análisis estadístico.

2.2 **EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento de la proporción de células con aberraciones cromosómicas relacionado con la dosis, claro aumento del número de células que presentan aberraciones en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (6). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales

El aumento de la poliploidía puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de producir aberraciones cromosómicas numéricas. El aumento de la endorreduplicación puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir la progresión del ciclo celular (7)(8).

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas en la médula ósea de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en la médula ósea de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos pasen al torrente circulatorio o lleguen específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo;
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas;
- número, edad y sexo de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.;
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

- controles positivos y negativos (vehículo o disolvente);
- datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo;
- fundamento de la selección de la dosis;
- preparación de la sustancia de ensayo;
- administración de la sustancia de ensayo;
- fundamento de la elección de la vía de administración;
- métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso;
- conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede;
- calidad de los alimentos y el agua;
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras;
- métodos de determinación de la toxicidad;
- sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración del tratamiento;
- métodos de preparación de los portaobjetos;
- criterios de recuento de las aberraciones;
- número de células analizadas por animal;
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- signos de toxicidad;
- índice mitótico;
- tipo y número de aberraciones observadas en cada animal;
- número total de aberraciones por lote, medias y desviaciones estándar;
- número de células con aberraciones por lote, medias y desviaciones estándar;
- variaciones de la ploidía, en su caso;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos, si se han realizado;
- datos de los controles negativos realizados en paralelo;
- datos sobre controles históricos negativos, intervalos, medias y desviaciones estándar;
- datos de los controles positivos realizados en paralelo.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. En: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*. S. Venitt y J.M. Parry (Eds.). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
2. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. y Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res.*, 189, 157-165.
3. Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. y Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. En: D.J. Kirkland (ed.) *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
4. Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. y Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, 312, 305-312.
5. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. y Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
6. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. y Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. En: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.
7. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.* 119, 403-413.
8. Huang, Y., Change, C. y Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

B. 12. MUTAGENICIDAD – ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

EN ERITROCITOS DE MAMÍFERO *IN VIVO*

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 474 sobre el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero (1997).

1.1 INTRODUCCIÓN

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general roedores).

El ensayo de micronúcleos tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados.

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas.

En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. La detección de eritrocitos inmaduros (policromáticos) micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero o de ADN centromérico en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros (policromáticos) micronucleados. Si los animales se tratan de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede emplearse como parámetro en el ensayo el número de eritrocitos maduros (normocromáticos) con micronúcleos en la sangre periférica respecto a un número determinado de eritrocitos maduros.

El presente ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2 DEFINICIONES

Centrómero (cinetocoro): región (o regiones) del cromosoma que se asocia a las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

Micronúcleo: núcleo pequeño, adicional al núcleo celular principal y separado de él, y producido durante la telofase de la mitosis o la meiosis por fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros retardados.

Eritrocito normocromático: eritrocito maduro que carece de ribosomas y que se distingue del eritrocito policromático (inmaduro) mediante tinción selectiva de los ribosomas.

Eritrocito policromático: eritrocito inmaduro, en una fase intermedia de transformación, que aún tiene ribosomas y puede, por tanto, distinguirse del eritrocito normocromático (maduro) mediante tinción selectiva de dichos orgánulos.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada. Si se utiliza médula ósea, se sacrifican los animales a intervalos apropiados tras el tratamiento, se extrae la médula ósea, se preparan los portaobjetos y se tiñen (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Si se emplea sangre periférica, se extrae a intervalos apropiados tras el tratamiento, se preparan frotis y se tiñen (4)(8)(9)(10). En los estudios con sangre periférica las células deben recolectarse lo antes posible después de la última exposición. Se analizan las preparaciones para detectar la presencia de micronúcleos.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Preparación

1.4.1.1 Selección de la especie animal

Si se emplea médula ósea, se recomienda el uso de ratones o ratas, pero también pueden utilizarse otras especies de mamíferos adecuadas. Si se emplea sangre periférica, se recomienda el uso de ratones. Ahora bien, puede utilizarse cualquier otro mamífero adecuado, siempre que se trate de una especie en la que el bazo no elimine los eritrocitos micronucleados o en la que se haya demostrado una sensibilidad adecuada para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Deben usarse animales jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2 Alojamiento y alimentación de los animales

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60 %.

1.4.1.3 *Preparación de los animales*

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes control. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos.

1.4.1.4 *Preparación de las dosis*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestran que es posible conservarlas.

1.4.2 **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1 *Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2 *Controles*

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en ambos sexos y en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían formarse micronúcleos *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto a la frecuencia de fondo. Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia del control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
N-etilo-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con micronúcleos aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Si se hace una sola toma de muestras en los controles negativos, el momento más oportuno para hacerla es tras el primer período de muestreo. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

Si se emplea sangre periférica, puede aceptarse como control negativo en paralelo una muestra previa al tratamiento, pero únicamente en los estudios cortos (por ejemplo, de 1 a 3 administraciones), si los resultados se encuentran en el intervalo previsto según controles anteriores.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 Número y sexo de los animales

Cada lote tratado y cada control ha de estar compuesto al menos por cinco hembras y cinco machos analizables (11). Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo. En caso de que la exposición humana a las sustancias pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2 Pauta de tratamiento

No se recomienda ninguna pauta normalizada (1, 2 o más administraciones a intervalos de 24 horas, etc.). Pueden aceptarse muestras tomadas en el marco de estudios de larga duración siempre que se haya demostrado que ese tipo de estudio proporciona resultados positivos o, si los resultados son negativos, que ha habido toxicidad o bien que se ha estado aplicando la dosis límite hasta el momento de tomar la muestra. También puede dividirse la dosis -por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo- con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades.

El ensayo puede realizarse de dos maneras:

- a) Se administra la sustancia de ensayo a los animales en una sola vez. Se extraen muestras de la médula ósea al menos dos veces, la primera de ellas cuando hayan transcurrido más de 24 horas, pero menos de 48 horas desde el tratamiento. Debe respetarse un intervalo adecuado entre las tomas. Si se extraen muestras antes de que transcurran 24 horas desde el tratamiento, deberá justificarse. Las muestras de sangre periférica han de tomarse al menos en dos ocasiones, la primera de ellas cuando haya transcurrido un mínimo de 36 horas desde el tratamiento. Tras la primera toma, se respetan intervalos adecuados, sin sobrepasar las 72 horas. Si se observa una respuesta positiva en una toma de muestras, no es preciso realizar más.
- b) Si se efectúan 2 o más administraciones diarias (por ejemplo, 2 o más administraciones a intervalos de 24 horas), ha de tomarse una muestra transcurridas de 18 a 24 horas desde la última administración si se trata de médula ósea, y de 36 a 48 horas desde la última administración en el caso de la sangre periférica (12).

Si procede, pueden aplicarse otros tiempos de muestreo adicionales.

1.5.3 **Dosis**

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal (13). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el último período de muestreo se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por dosis máxima la que produzca tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo, resultaría probablemente letal. Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en la médula ósea (por ejemplo, reducción de la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos en la médula ósea o la sangre periférica).

1.5.4 **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. En el caso de estudios de mayor duración, la dosis límite será de 2000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure hasta 14 días y de 1000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure más de 14 días. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5 **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a éste. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6 **Preparación de la médula ósea o la sangre periférica**

Por lo general, la médula ósea se extrae del fémur o la tibia de los animales recién sacrificados. Las células suelen tomarse del fémur o la tibia, se preparan y se tiñen según métodos establecidos. La sangre periférica se extrae de la vena caudal o de otro vaso sanguíneo adecuado. Las células hemáticas se someten inmediatamente a una tinción supravital (8)(9)(10) o se extienden en frotis y luego se tiñen. Si se emplea un colorante específico del ADN [por ejemplo, naranja de acridina (14) o Hoechst 33258 más pironina-Y (15)] pueden evitarse algunos de los artefactos que aparecen cuando se utiliza un colorante que no es específico del ADN, pero no por ello han de descartarse los colorantes convencionales (coloración de Giemsa, etc.). También pueden utilizarse otros sistemas [por ejemplo, columnas de celulosa para eliminar las células nucleadas (16)], siempre que se tenga constancia de que resultan adecuados para la preparación de micronúcleos en laboratorio.

1.5.7 Análisis

Para cada animal, se determina la relación entre los eritrocitos inmaduros y el total de eritrocitos (inmaduros + maduros) en un recuento de al menos 200 eritrocitos si se trata de médula ósea y de 1000 si se trata de sangre periférica (17). Antes de analizarlos al microscopio, se codifican independientemente todos los portaobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Se determinará la cantidad de eritrocitos inmaduros micronucleados en un mínimo de 2000 eritrocitos inmaduros por animal. Puede obtenerse más información contando los eritrocitos maduros con micronúcleos. En el análisis de los portaobjetos la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos no debe ser inferior al 20 % del valor del control. Si los animales han sido tratados de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede determinarse la cantidad de micronúcleos en un mínimo de 2000 eritrocitos maduros por animal. Pueden emplearse sistemas de análisis automatizados (análisis de la imagen o citometría de flujo continuo de suspensiones celulares) en lugar del recuento manual, siempre que estén debidamente justificados y validados.

2. RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Para cada animal analizado se relacionará por separado el número de eritrocitos inmaduros, el de eritrocitos inmaduros micronucleados y la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos. Si los animales han sido tratados de forma continua durante cuatro semanas o más, se proporcionarán también los datos relativos a los eritrocitos maduros, caso de haberse recogido. Se facilitarán, para cada animal, la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de los mismos y, si procede, el porcentaje de eritrocitos micronucleados. Si no se observan diferencias en la respuesta de un sexo y otro, los datos relativos a ambos sexos pueden considerarse conjuntamente en el análisis estadístico.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento del número de células micronucleadas relacionado con la dosis, claro aumento del número de dichas células en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (18)(19). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de micronúcleos indica que la sustancia de ensayo induce la formación de micronúcleos, que son consecuencia de una lesión de los cromosomas o del aparato mitótico de los eritroblastos de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no induce la formación de micronúcleos en los eritrocitos inmaduros de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos pasen al torrente circulatorio o lleguen específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo;
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas;
- número, edad y sexo de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.;
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

- datos de los controles positivos y negativos (vehículo o disolvente);
- datos relativos al estudio de determinación del intervalo de dosis, si se ha llevado a cabo;
- fundamento de la selección de la dosis;
- preparación de la sustancia de ensayo;
- administración de la sustancia de ensayo;
- fundamento de la elección de la vía de administración;
- métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso;
- conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede;
- calidad de los alimentos y el agua;
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras;
- métodos de preparación de los portaobjetos;
- métodos de determinación de la toxicidad;
- criterios de recuento de los eritrocitos inmaduros micronucleados;
- número de células analizadas por animal;
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- signos de toxicidad;
- proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos;
- número de eritrocitos inmaduros micronucleados observados en cada animal;
- media \pm desviación estándar de eritrocitos inmaduros micronucleados de cada lote;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos y métodos aplicados;
- datos de los controles históricos negativos y los realizados en paralelo al ensayo;
- datos de los controles positivos realizados en paralelo.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, 187-190.
2. Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, 9-15.
3. Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourmin, K., MacGregor, J.G. y Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* 123: 61-118.
4. Mavourmin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. y Heddle, J.A. (1990). The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, 29-80.
5. MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N. y Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. En: "Developments in Science and Practice of Toxicology", ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell y T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 555-558.
6. MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R. y Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. *Mutation Res.* 189: 103-112.
7. MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R. y Shelby, M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14: 513-522.
8. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. y Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. *Mutation Res.*, 245, 245-249.
9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. *Mutation Res.*, 278, 83-98.

10. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 153-159.
11. Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. y Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, 293-304.
12. Higashikuni, N. y Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 313-319.
13. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. y Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
14. Hayashi, M., Sofuni, T. y Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, 241-247.
15. MacGregor, J.T., Wehr, C.M. y Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.*, 120, 269-275.
16. Romagna, F. y Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, 91-104.
17. Gollapudi, B. y McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, 97-99.
18. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. y Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. En: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
19. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. y Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. En: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 13/14. MUTAGENICIDAD : ENSAYO DE MUTACIÓN INVERSA EN BACTERIAS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del los documento OCDE TG 471 sobre el ensayo de mutación inversa en bacterias (1997).

1.1 INTRODUCCIÓN

En el ensayo de mutación inversa en bacterias se emplean cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* auxotróficas respecto a un aminoácido para detectar mutaciones puntuales que impliquen sustitución, adición o delección de uno o varios pares de bases del ADN (1)(2)(3). El ensayo se fundamenta en la detección de mutaciones que revierten mutaciones presentes en las cepas experimentales y restablecen la capacidad funcional de las bacterias de sintetizar un aminoácido esencial. Las bacterias revertientes se detectan por su capacidad de crecer en ausencia del aminoácido que la cepa experimental parental no es capaz de sintetizar.

Las mutaciones puntuales ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que dichas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores de las células somáticas intervienen en la formación de tumores en los seres humanos y los animales de experimentación. El ensayo de mutación inversa en bacterias es rápido, poco costoso y relativamente sencillo de realizar. Muchas de las cepas experimentales presentan algunas características que las hacen más sensibles para la detección de mutaciones: secuencias de ADN sensibles en los sitios de reversión, mayor permeabilidad celular a las moléculas grandes y eliminación de sistemas de reparación del ADN o intensificación de los procesos de reparación del ADN propensos a errores. La especificidad de las cepas experimentales puede proporcionar información útil sobre los tipos de mutaciones inducidas por sustancias genotóxicas. Existe una importante base de datos relativa a una gran variedad de estructuras que recoge los resultados de ensayos de mutación inversa en bacterias. Asimismo, se han desarrollado metodologías bien consolidadas para analizar productos químicos, incluidos los compuestos volátiles, con diferentes propiedades fisicoquímicas.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2 DEFINICIONES

Ensayo de mutación inversa en *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*: ensayo que permite detectar una mutación en una cepa auxótrofa para un aminoácido (histidina y triptófano, respectivamente), que la transforma en una cepa independiente del aporte externo de dicho aminoácido.

Mutágenos que provocan la sustitución de un par de bases: agentes que provocan el cambio de una base en el ADN. En un ensayo de reversión el cambio puede producirse en el sitio de la mutación original o en un segundo sitio del genoma bacteriano.

Mutágenos que desplazan el marco de lectura: agentes que provocan la adición o delección de uno o más pares de bases en el ADN, lo que modifica el marco de lectura en el ARN.

1.3 CONSIDERACIONES INICIALES

En el ensayo de mutación inversa en bacterias se utilizan células procariotas, que difieren de las células de mamífero en aspectos como la absorción, el metabolismo, la estructura cromosómica y los procesos de reparación del ADN. En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien tales sistemas no pueden reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Por tanto, el ensayo no proporciona información directa sobre la potencia mutagénica y carcinogénica de una sustancia determinada en mamíferos.

El ensayo de mutación inversa en bacterias se emplea habitualmente para hacer una selección inicial de la actividad genotóxica y, en particular, de la actividad inductora de mutaciones puntuales. Una importante base de datos ha puesto de manifiesto que muchas sustancias químicas que dan un resultado positivo en este ensayo también presentan actividad mutagénica en otros ensayos. También hay agentes mutagénicos que no son detectados por este ensayo. Esas deficiencias pueden deberse a la naturaleza específica del efecto detectado, a diferencias de la activación metabólica o de la biodisponibilidad. Por otra parte, los factores que incrementan la sensibilidad del ensayo de mutación inversa en bacterias pueden llevar a sobrestimar la actividad mutagénica.

El ensayo de mutación inversa en bacterias puede no ser apropiado para evaluar determinadas clases de sustancias químicas como los compuestos muy bactericidas (por ejemplo, algunos antibióticos) y aquéllos de los que se cree (o se sabe) que interfieren de forma específica en el sistema de replicación celular de los mamíferos (por ejemplo, algunos inhibidores de la topoisomerasa y algunos análogos de los nucleósidos). En esos casos están más indicados los ensayos de mutaciones en mamíferos.

Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo son carcinógenos para los mamíferos, la correlación no es absoluta, sino que depende de la clase química. Además de ello, hay carcinógenos que el ensayo no detecta, pues actúan por mecanismos que no son genotóxicos o que no existen en las células bacterianas.

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen las suspensiones de células bacterianas a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica exógena. En el método de incorporación en placa, las suspensiones se mezclan con agar de recubrimiento y se vierten inmediatamente sobre una placa en medio mínimo. En el método de preincubación, la mezcla de tratamiento se incuba y luego se mezcla con agar de recubrimiento antes de verterla sobre una placa en medio mínimo. En ambos casos, tras dos o tres días de incubación, se cuentan las colonias revertientes y se compara su cantidad con la de colonias revertientes espontáneas en las placas control con disolvente.

Entre los diversos procedimientos descritos para realizar el ensayo de mutación inversa en bacterias los siguientes métodos se utilizan comúnmente: incorporación en placa (1)(2)(3)(4), preincubación (2)(3)(5)(6)(7)(8), fluctuación (9)(10) y suspensión (11). También se han descrito modificaciones para los ensayos con gases y vapores (12).

Los procedimientos descritos en el método corresponden principalmente a la incorporación en placa y a la preincubación. Ambos son aceptables para realizar experimentos con y sin activación metabólica. El método de preincubación resulta más eficaz para detectar determinadas sustancias que pertenecen a clases químicas que incluyen nitrosaminas alifáticas de cadena corta, metales divalentes, azocolorantes y diazocompuestos, alcaloides de la pirolizidina, compuestos alílicos y nitrocompuestos (3). También se reconoce que algunas clases de mutágenos no siempre se detectan con procedimientos ordinarios como los métodos de incorporación sobre placa y de preincubación. Esos casos deben considerarse “especiales” y se recomienda seriamente utilizar otros procedimientos para detectarlos. Se han determinado los siguientes “casos especiales” (junto con ejemplos de procedimientos de detección eficaces): azocolorantes y diazocompuestos (3)(5)(6)(13), gases y sustancias químicas volátiles (12)(14)(15)(16) y glicósidos (17)(18). Cualquier desviación respecto al procedimiento ordinario ha de estar científicamente justificada.

1.5 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1 Preparación

1.5.1.1 Bacterias

Se dejan crecer cultivos bacterianos recientes hasta el final de la fase exponencial o hasta el principio de la fase estacionaria (unas 10^9 células por ml). No deben emplearse cultivos que se encuentren al final de la fase estacionaria. Es fundamental que los cultivos utilizados para el experimento contengan un título elevado de bacterias viables. El título puede demostrarse sobre la base de datos de controles anteriores sobre curvas de crecimiento o bien determinando en cada ensayo el número de células viables mediante un experimento de cultivo en placas.

La temperatura de incubación recomendada es de 37°C.

Se emplearán al menos cinco cepas bacterianas, de las cuales cuatro serán de *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537, TA97a o TA97; TA98 y TA100), de fiabilidad demostrada y cuya respuesta sea reproducible entre laboratorios. Esas cuatro cepas de *S. typhimurium* poseen pares de bases GC en el sitio de reversión primaria y se sabe que no son capaces de detectar determinados mutágenos oxidantes, agentes de entrecruzamiento e hidracinas. Dichas sustancias son detectadas por las cepas *E. coli* WP2 y *S. typhimurium* TA102 (19), que poseen un par de bases AT en el sitio de reversión primaria. Así pues, se recomienda la siguiente combinación de cepas:

- *S. typhimurium* TA1535 y
- *S. typhimurium* TA1537 o TA97o TA97a, y
- *S. typhimurium* TA98 y
- *S. typhimurium* TA100 y
- *E. coli* WP2 uvrA o *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) o *S. typhimurium* TA102.

Para detectar mutágenos de entrecruzamiento puede ser mejor incluir TA102 o añadir una cepa de *E. coli* eficaz en la reparación de ADN [por ejemplo, *E. coli* WP2 o *E. coli* WP2 (pKM101)].

Se seguirán procedimientos reconocidos de preparación de cultivos madre, comprobación de marcadores y conservación. Debe demostrarse en cada preparación de cultivo madre congelado que es necesario aportar el aminoácido en cuestión para que haya crecimiento (histidina en las cepas de *S. typhimurium* y triptófano en las de *E. coli*). Se controlarán de igual manera otras características fenotípicas, en concreto la presencia o ausencia de factores R, si procede [resistencia a la ampicilina en las cepas TA98, TA100 y TA97a o TA97, WP2 uvrA y WP2 uvrA (pKM101), y a la ampicilina + tetraciclina en la cepa TA102] y la presencia de mutaciones características (mutación rfa en *S. typhimurium* mediante la sensibilidad al violeta cristal, y mutación uvrA en *E. coli* o uvrB en *S. typhimurium*, mediante la sensibilidad a la luz ultravioleta) (2)(3). Las cepas deben producir un número de colonias revertientes espontáneas por placa en las gamas de frecuencia esperadas sobre la base de datos de controles anteriores del laboratorio y preferiblemente en la gama recogida en publicaciones.

1.5.1.2 Medio

Se emplearán un agar mínimo adecuado (por ejemplo, con medio mínimo E de Vogel-Bonner y glucosa) y un agar de recubrimiento con histidina y biotina o triptófano para permitir pocas divisiones celulares (1)(2)(9).

1.5.1.3 Activación metabólica

Las bacterias deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (1)(2) o una mezcla de fenobarbital y β -naftoflavona (18)(20)(21). La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 5 al 30% v/v en la mezcla S9. La elección y la condición de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase de sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial. En el caso de los azocolorantes y los diazocompuestos puede estar más indicado utilizar un sistema reductor de activación metabólica (6)(13).

1.5.1.4 Preparación de la sustancia de ensayo

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las bacterias. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las bacterias y la actividad de la S9 (22). Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o un vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua.

1.5.2 Condiciones de ensayo

1.5.2.1 Cepas de ensayo (véase el apartado 1.5.1.1)

1.5.2.2 Concentraciones de exposición

Para determinar la mayor concentración de la sustancia de ensayo deben considerarse, entre otros criterios, la citotoxicidad y la solubilidad en la mezcla de tratamiento final.

Puede ser útil determinar la toxicidad y la insolubilidad en un experimento preliminar. La citotoxicidad puede manifestarse por una reducción del número de colonias revertientes, la disminución o la aclaración de la confluencia del cesped bacteriano, o la tasa de supervivencia de los cultivos tratados. La citotoxicidad de una sustancia puede verse alterada en presencia de sistemas de activación metabólica. Ha de valorarse la insolubilidad en forma de precipitación en la mezcla final en las condiciones reales de ensayo, visible por simple observación.

Si se trata de sustancias de ensayo solubles y no citotóxicas, la concentración máxima recomendada es de 5 mg/placa o 5 µl/placa. En el caso de sustancias no citotóxicas que no sean solubles a dicha concentración, una o varias de las concentraciones empleadas resultarán insolubles en la mezcla de tratamiento final. Las sustancias de ensayo que ya sean citotóxicas por debajo de 5 mg/placa o 5 µl/placa deberán ensayarse a concentraciones que llegarán como máximo hasta la concentración citotóxica. El precipitado no ha de interferir en la evaluación.

Se emplearán al menos cinco concentraciones analizables de la sustancia de ensayo con intervalos semilogarítmicos aproximadamente ($\sqrt{10}$) para el experimento inicial. Si se está estudiando la relación respuesta-concentración, puede estar indicado emplear intervalos menores. Para evaluar sustancias que contengan cantidades considerables de impurezas potencialmente mutagénicas podrá considerarse el uso de concentraciones superiores a 5 mg/placa o 5 µl/placa.

1.5.2.3 Controles positivos y negativos

En todos los experimentos deberán realizarse en paralelo controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) específicos de la cepa utilizada, con y sin activación metabólica. Se seleccionarán las concentraciones del control positivo que demuestren ser eficaces en cada experimento.

En los experimentos con sistema de activación metabólica, la sustancia o sustancias de referencia del control positivo se elegirán con arreglo al tipo de cepa bacteriana empleada.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias adecuadas para los controles positivos en ensayos con activación metabólica:

Nº CA	Nº EINECS	Denominación
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantraceno
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenzo[<i>a</i>]antraceno
50-32-8	200-028-5	benzo[<i>a</i>]pireno
613-13-8	210-330-9	2-aminoantraceno
50-18-0	200-015-4	ciclofosfamida
6055-19-2		monohidrato de ciclofosfamida

La siguiente sustancia es apropiada para el control positivo del método de activación metabólica reductora:

573-58-0	209-358-4	Rojo Congo
----------	-----------	------------

El 2-aminoantraceno no ha de emplearse como único indicador de la eficacia de la mezcla S9. Caso de emplearlo, todos los lotes de S9 han de caracterizarse asimismo con un mutágeno que requiera activación metabólica mediante enzimas microsomales, como el benzo[a]pireno o el dimetilbenzoantraceno.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos específicas de determinadas cepas para ensayos sin sistema de activación metabólica exógena:

Nº CAS	Nº EINECS	Denominación	Cepa
26628-22-8	247-852-1	azida de sodio	TA 1535 y TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoreno	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoacridina	TA 1537, TA 97 y TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 y TA 97a
80-15-9	201-254-7	hidroperóxido de cumeno	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicina C	WP2 uvrA y TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	WP2, WP2uvrA y WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitroquinolina-1-óxido	WP2, WP2uvrA y WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furilfuramida (AF2)	cepas que contengan plásmidos

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. Deberá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Se realizarán controles negativos sin sustancia de ensayo, únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán de igual manera que los lotes tratados. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior sobre controles que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.5.3 **Procedimiento**

En el método de incorporación sobre placa (1)(2)(3)(4), sin activación metabólica, suele mezclarse 0,05 ml o 0,1 ml de las soluciones de ensayo, 0,1 ml de cultivo bacteriano fresco (aproximadamente 10^8 células viables) y 0,5 ml de solución tampón estéril con 2,0 ml de agar de recubrimiento. En el ensayo con activación metabólica suele añadirse 0,5 ml de mezcla de activación metabólica que contenga una cantidad adecuada de fracción postmitocondrial (del 5 al 30% v/v en dicha mezcla) al agar de recubrimiento (2,0 ml), las bacterias y la sustancia o solución de ensayo. Se mezcla el contenido de cada tubo y se vierte sobre una placa de agar mínimo. Se deja solidificar el agar de recubrimiento antes de incubar.

En el método de preincubación (2)(3)(5)(6) se incuba la sustancia o solución de ensayo con la cepa experimental (aproximadamente 10^8 células viables) y la solución tampón de ensayo o el sistema de activación metabólica (0,5 ml), por lo general durante 20 minutos o más a 30-37°C. Después se añade el agar de recubrimiento y se vierte sobre una placa de agar mínimo. Habitualmente se mezcla 0,05 ó 0,1 ml de sustancia o solución de ensayo, 0,1 ml de cultivo bacteriano y 0,5 ml de mezcla S9 o solución tampón estéril con 2,0 ml de agar de recubrimiento. Se airean los tubos durante la preincubación con un agitador.

Se prepararán tres placas por cada dosis para estimar adecuadamente la variación. Pueden prepararse sólo dos placas por dosis si se justifica científicamente. La pérdida ocasional de una placa no invalida necesariamente el ensayo.

Las sustancias gaseosas o volátiles han de someterse a ensayo con métodos adecuados (recipientes de cultivo herméticos, etc.) (12)(14)(15)(16).

1.5.4 **Incubación**

Se incuban todas las placas de un mismo ensayo entre 48 y 72 horas a 37°C. Al término de la incubación, se cuenta el número de colonias revertientes por placa.

2. RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se facilitará el número de colonias revertientes por placa, así como el número de colonias revertientes en las placas del control negativo (control con disolvente y control sin tratar, en su caso) y del positivo. Debe proporcionarse el recuento por placa, la media de colonias revertientes por placa y la desviación estándar correspondientes a la sustancia de ensayo y a los controles positivos y negativos (sin tratar y/o con disolvente).

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. Los resultados negativos se confirmarán caso por caso. Los casos en que dicha confirmación no se considere necesaria deberán justificarse. En los experimentos ulteriores se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentra la separación entre concentraciones, el método de tratamiento (incorporación sobre placa o preincubación líquida) y las condiciones de activación metabólica.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración en la gama utilizada y/o aumento reproducible con una o varias concentraciones en el número de colonias revertientes por placa al menos en una cepa, con o sin sistema de activación metabólica, etc.) (23). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (24). No obstante, el hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

No se considerarán mutágenas en el ensayo las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de mutación inversa en bacterias indica que la sustancia de ensayo induce mutaciones puntuales por sustitución de bases o desplazamientos del marco de lectura en el genoma de *Salmonella typhimurium* y/o *Escherichia coli*. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no resulta mutagénica en la especie estudiada.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del disolvente o vehículo;
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Cepas:

- cepas utilizadas;
- número de células por cultivo;
- características de las cepas.

Condiciones del ensayo:

- cantidad de sustancia de ensayo por placa (mg/placa o µl/placa), fundamento de la selección de las dosis y número de placas por concentración;
- medios utilizados;
- tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad;
- procedimientos de tratamiento.

Resultados:

- signos de toxicidad
- signos de precipitación;
- recuentos por placa;
- cantidad media de colonias revertientes por placa y desviación estándar;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos, si se han realizado;
- datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo, intervalos, medias y desviaciones estándar;
- datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ames, B.N., McCann, J. y Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
2. Maron, D.M. y Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. y Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233.
4. Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. y Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, 69-240.
5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. y Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, 91-96.
6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. y Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. En: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.
7. Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. y Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. En: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
8. Aeschacher, H.U., Wolleb, U. y Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, 167-177.
9. Green, M.H.L., Muriel, W.J. y Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, 33-42.
10. Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. y J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. En: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. 2ª edición. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. y Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
11. Thompson, E.D. y Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, 453-465.
12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. y T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Res.*, 307, 335-344.
13. Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. y Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. *Mutation Res.*, 136, 33-47.
14. Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. y Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, 2-141.
15. Simmon, V., Kauhanen, K. y Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges y F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
16. Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. y Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, 421-441.

17. Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., y Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, 39, 3780-3782.
18. Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. y Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4961-4965.
19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. y Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. *Mutagenesis*, 5, 285-291.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. y Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. En: "In Vitro metabolic Activation in Mutagenesis Testing", eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
21. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. y Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. y Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. *Mutation Res.*, 88 343-350.
23. Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. y Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. *Mutation Res.* 189, 83-91.
24. Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. y Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. En: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

B. 15
ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS Y DETECCIÓN DE CARCINOGENESIS — MUTACIÓN GÉNICA —
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. **MÉTODO**

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

Diversas cepas haploides y diploides de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pueden utilizarse para determinar la producción de mutaciones génicas por agentes químicos con y sin activación metabólica.

Es posible determinar la mutación directa en cepas haploides, en especial mediante la apreciación de la conversión de mutantes rojos consumidores de adenina (ade-1, ade-2) en una forma blanca que la precisa en cantidad doble, así como por sistemas selectivos, como la inducción de resistencia a la canavanina y la cicloheximida.

El método de mutación inversa, el más utilizado, comprende la utilización de la cepa haploide XV 185-14C, portadora de las mutaciones sin sentido ocres ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 y trp 5-48, reversibles mediante mutágenos causantes de sustituciones de bases que induzcan mutaciones en un punto específico o mutaciones supresoras ocres. La cepa XV 185-14C también lleva el marcador his 1-7, una mutación sin sentido invertida principalmente por mutaciones de segundo punto, y el marcador hom 3-10, invertido por mutágenos que desplazan el marco de lectura del código genético (*frameshift mutagens*).

De las cepas diploides de *S. cerevisiae*, la única que se utiliza ampliamente es D₇, homocigota para ilv 1-92.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Se prepararán soluciones de las sustancias químicas estudiadas y las de control inmediatamente antes de la prueba con ayuda de un vehículo apropiado. Cuando se trate de compuestos orgánicos no hidrosolubles, los disolventes orgánicos, como etanol, acetona o dimetilsulfóxido (DMSO), deberán emplearse en una concentración no superior al 2% v/v. La concentración final del vehículo no debe influir de modo notable en la viabilidad de las células y en las características de crecimiento.

Activación metabólica

Las células han de exponerse a las sustancias analizadas en presencia de un sistema de activación metabólica exógena apropiado.

El método de uso más frecuente consiste en añadir la fracción posmitocondrial preparada a partir de hígados de roedores tratados previamente con inductores enzimáticos, a la que se añaden cofactores. También puede considerarse oportuno para la activación metabólica el empleo de especies, tejidos, fracciones posmitocondriales o métodos distintos.

Condiciones del ensayo

Cepas experimentales

La cepa haploide XV 185-14C y la cepa diploide D₇ son las más utilizadas en estudios de mutación génica, pero también pueden ser apropiadas otras cepas.

Medios

Se utilizan medios de cultivo apropiados para la determinación del número de supervivientes y mutantes.

Uso de testigos negativos y positivos

Se utilizarán testigos positivos no tratados y tratados con disolventes de modo simultáneo. Es preciso utilizar sustancias químicas de control positivas para cada finalidad de mutación específica.

Concentración de exposición

Se utilizarán, al menos, 5 concentraciones debidamente escalonadas de la sustancia estudiada. En caso de sustancias tóxicas, la concentración máxima probada no reducirá el índice de supervivencias a menos del 5-10%. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta su límite de solubilidad mediante métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Condiciones de incubación

Las placas se incuban en la oscuridad, a 28-30 ° C, durante 4-7 días.

Frecuencia de mutación espontánea

Se utilizarán subcultivos cuyas frecuencias de mutaciones espontáneas estén dentro de los límites normales admitidos.

Número de repeticiones

Se utilizarán al menos 3 placas por concentración, a fin de determinar los prototifos producidos por mutación génica, y para observar la viabilidad de las células. Si en los experimentos se emplearan marcadores, como hom 3-10, con tasa de mutaciones baja, puede aumentarse el número de placas utilizadas para lograr datos estadísticamente pertinentes.

Procedimiento

Las cepas de *S. cerevisiae* suelen tratarse en el curso de una prueba en medio líquido en la que se utilizan células en fase estacionaria o de crecimiento. Las experiencias iniciales deberán realizarse sobre células en crecimiento. Se expone a $1-5 \times 10^7$ células/ml a la sustancia objeto de estudio durante un período de hasta 18 horas a 28-37 ° C, con agitación de la mezcla; durante el tratamiento, se añade una cantidad adecuada de un sistema de activación metabólica.

Si la primera experiencia da resultados negativos, se procederá a una segunda, en esta ocasión con células en fase estacionaria; si los resultados de la primera fueran positivos, se confirmarán en una experiencia independiente. Al final del tratamiento, las células se centrifugan, lavan y siembran en un medio de cultivo apropiado. Tras la incubación, se examinan las placas para determinar la supervivencia y la inducción de mutaciones génicas.

2.

RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de colonias contadas, el de mutantes, el índice de supervivencia y la frecuencia de mutantes. Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente. Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. **INFORME**

3.1. **Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- cepa utilizada
- condiciones del ensayo: células en fase estacionaria o de crecimiento, composición de los medios, temperatura y duración de la incubación, sistema de activación metabólica
- condiciones de tratamiento: niveles de exposición, procedimiento y duración del tratamiento, temperatura del tratamiento, controles positivos y negativos
- número de colonias contadas, número de mutantes, supervivencia y frecuencia de mutantes, relación dosis-respuesta si es posible, evaluación estadística de los datos
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 16

RECOMBINACIÓN MITÓTICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

En *Saccharomyces cerevisiae*, es posible apreciar la recombinación mitótica entre los genes (o, más generalmente, entre un gen y su centrómero) y en el interior de ellos. En el primer caso, se habla de *crossing-over*, generador de intercambios recíprocos, en tanto que, en el segundo los intercambios, casi nunca son recíprocos, y se habla de conversión génica. El *crossing-over* se determina generalmente por la producción de colonias o sectores recesivos homocigotos a partir de una cepa heterocigota, mientras que la conversión génica lo es mediante la producción de inversores prototróficos en una cepa auxotrofa heteroalélica portadora de dos alelos defectuosos distintos del mismo gen. Las cepas de uso más frecuente para descubrir una conversión génica mitótica son D₄ (heteroalélica para *ade 2* y *trp 5*), D₇ (heteroalélica para *trp 5*), BZ₁₄ (heteroalélica para *arg 4*) y JD1 (heteroalélica para *his 4* y *trp 5*). El *crossing-over* mitótico productor de sectores homocigotos de color rojo y rosa se determina en D₅ o en D₇ (que también sirve para analizar la conversión génica mitótica y la mutación inversa para *ilv 1-92*), cepas ambas heteroalélicas complementarias de los alelos *ade 2*.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se preparan soluciones de las sustancias químicas estudiadas, y de los compuestos de control y de referencia, inmediatamente antes del ensayo, con ayuda de un vehículo apropiado. Cuando se trate de compuestos orgánicos no hidrosolubles, los disolventes orgánicos como etanol, acetona o dimetilsulfóxido (DMSO), deberán emplearse en una concentración no superior al 2% v/v. La concentración final del vehículo no debe influir de modo notable en la viabilidad de las células ni en las características de crecimiento.

Activación metabólica

Las células han de exponerse a las sustancias analizadas en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena apropiado. El método de uso más frecuente consiste en añadir a la fracción posmitocondrial preparada a partir de hígados de roedores tratados previamente con inductores enzimáticos, a la que se añaden cofactores. También puede considerarse oportuno para la activación metabólica el empleo de especies, tejidos, fracciones posmitocondriales o métodos distintos.

Condiciones del ensayo

Cepas experimentales

Las cepas que se utilizan con más frecuencia son las diploides D₄, D₅, D₇ y JD1, pero también pueden considerarse apropiadas otras.

Medios

Se utilizan medios de cultivo apropiados para la determinación de la supervivencia y de la frecuencia de recombinación mitótica.

Uso de testigos negativos y positivos

Se utilizarán testigos positivos no tratados y tratados con disolvente de modo simultáneo. Es preciso utilizar sustancias químicas de control positivas apropiadas para cada finalidad de recombinación específica.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán, al menos, cinco concentraciones debidamente escalonadas de la sustancia estudiada. Entre los factores que deben tenerse en cuenta figuran la citotoxicidad y la solubilidad. La concentración mínima no debe influir en modo alguno en la viabilidad celular. En casos de sustancias tóxicas, la concentración máxima probada no reducirá el índice de supervivencia a menos del 5-10%. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta su límite de solubilidad mediante métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Las células pueden exponerse a las sustancias estudiadas en la fase estacionaria o durante el crecimiento hasta completar períodos de 18 horas, como máximo. No obstante, si se utilizan períodos de tratamiento largos, hay que examinar al microscopio los cultivos por si aparecen esporas, ya que su presencia invalidaría la prueba.

Condiciones de incubación

Las placas se incuban en la oscuridad, a 28-30 °C, durante cuatro o siete días. Las placas que se utilicen para la determinación de los sectores homocigotos rojo y rosa producidos por *crossing-over* mitótico se conservarán en frigorífico a ± 4 °C durante uno o dos días más antes de la evaluación, a fin de que pueda intensificarse la pigmentación de las colonias de interés.

Frecuencia de recombinaciones mitóticas espontáneas

Se utilizarán subcultivos cuyas frecuencias de recombinaciones mitóticas espontáneas estén dentro de los límites normales admitidos.

Número de repeticiones

Se sembrarán al menos tres placas por concentración para determinar tanto la viabilidad como el número de prototrofos producidos por conversión génica mitótica. En caso de determinación de homocigosis recesiva producida por *crossing-over* mitótico, se aumentará el número de placas para obtener un número adecuado de colonias.

Procedimiento

Las cepas de *S. cerevisiae* suelen tratarse en el curso de una prueba en medio líquido en la que se utilizan células en fase estacionaria o de crecimiento. Las experiencias iniciales deberán realizarse sobre células en crecimiento. Se expone a $1-5 \times 10^7$ células/ml a la sustancia objeto de estudio durante un período de hasta 18 horas a 28-37 °C, con agitación de la mezcla; durante el tratamiento, se añade, si procede, una cantidad adecuada de un sistema de activación metabólica.

Al final del tratamiento, las células se centrifugan, lavan y siembran en un medio de cultivo apropiado. Tras la incubación se examinan las placas para determinar la supervivencia y la inducción de recombinación mitótica.

Si la primera experiencia da resultados negativos, se procederá a una segunda, en esta ocasión con células en fase estacionaria; si los resultados de la primera fueran positivos, se confirmarán en una experiencia independiente.

2.

RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de colonias contadas, el de recombinantes, el índice de supervivencia y la frecuencia de recombinantes.

Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. **INFORME**

3.1. **Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- cepa utilizada
- condiciones del ensayo: células en fase estacionaria o de crecimiento, composición de los medios, temperatura y duración de la incubación, sistema de activación metabólica
- condiciones del tratamiento: niveles de exposición, procedimiento y duración del tratamiento, temperatura del tratamiento; controles positivos y negativos
- número de colonias contadas, número de recombinantes, supervivencia y frecuencia de recombinación, relación dosis-respuesta si es posible, evaluación estadística de los datos
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 17. MUTAGENICIDAD – ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS

DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 476 sobre el ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* (1997).

1.1 INTRODUCCIÓN

El ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* puede realizarse para detectar mutaciones génicas inducidas por sustancias químicas. Entre las líneas celulares adecuadas para el ensayo se encuentran las células de linfoma de ratón L5178Y, las líneas celulares CHO, CHO-AS52 y V79 del hámster chino y las células linfoblastoides humanas TK6 (1). En dichas líneas celulares, los parámetros genéticos más empleados revelan una mutación en los loci de la timidinquinasa (TK) y la hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRT), y en un transgen de la xantina guanina fosforibosiltransferasa (XPRT). Los ensayos de mutación TK, HPRT y XPRT detectan diversos espectros de fenómenos genéticos. La localización autosómica de TK y XPRT permite poner de manifiesto fenómenos genéticos (por ejemplo, deleciones importantes) que no se detectan en el locus HPRT de los cromosomas X (2)(3)(4)(5)(6).

En este ensayo pueden emplearse cultivos de líneas celulares establecidas o estirpes celulares. Las células deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo y la estabilidad de la frecuencia de mutaciones espontáneas.

En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien éste no puede reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Deben evitarse las circunstancias que puedan conducir a resultados que no reflejen la mutagenicidad intrínseca. Los resultados positivos que no reflejan la mutagenicidad intrínseca pueden deberse a cambios en el pH, la osmolalidad o altos grados de citotoxicidad (7).

El ensayo se emplea para detectar las posibles sustancias mutágenas o carcinógenas para los mamíferos. Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo son carcinógenos para los mamíferos, no hay una correlación absoluta entre los resultados del mismo y la carcinogenicidad. La correlación depende de la clase química. Además de ello, cada vez hay más pruebas de que existen carcinógenos que el ensayo no detecta, pues, al parecer, éstos actúan por mecanismos no genotóxicos o mecanismos ausentes en las células bacterianas (6).

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2 DEFINICIONES

Mutación directa: mutación génica del tipo parental a la condición mutante, que da lugar a una alteración o pérdida de la actividad enzimática o la función de la proteína codificada.

Mutágenos que provocan la sustitución de un par de bases: sustancias que provocan la sustitución de uno o varios pares de bases en el ADN.

Mutágenos que desplazan el marco de lectura: sustancias que provocan la adición o deleción de uno o más pares de bases en la molécula de ADN.

Periodo de expresión fenotípica: tiempo que tardan en desaparecer los productos génicos inalterados de las células mutadas recientemente.

Frecuencia de mutantes: número de células mutantes dividido por el número de células viables.

Crecimiento total relativo: aumento del número de células en el tiempo respecto a una población celular control; es el producto del crecimiento en suspensión respecto al control negativo por la eficacia de clonado respecto al control negativo.

Crecimiento en suspensión relativo: aumento del número de células durante el periodo de expresión respecto al control negativo.

Viabilidad: eficacia de clonado de las células tratadas en el momento de la siembra en condiciones selectivas tras el periodo de expresión.

Supervivencia: eficacia de clonado de las células tratadas cuando se siembran al final del periodo de tratamiento; suele expresarse respecto a la supervivencia de la población celular control.

1.3

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las células deficientes en timidinquinasa (TK) a causa de la mutación $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ son resistentes a los efectos citotóxicos de la trifluorotimidina (TFT), análogo de la pirimidina. Las células capaces de producir timidinquinasa son sensibles a la TFT, que inhibe el metabolismo y detiene la división celular. Así pues, las células mutantes son capaces de proliferar en presencia de TFT, mientras que las células normales, que contienen timidinquinasa, no lo son. Del mismo modo, las células deficientes en HPRT o XPRT se seleccionan por su resistencia a la 6-tioguanina (TG) o la 8-azaguanina (AG). Si en los ensayos de mutación génica en células de mamífero se utiliza una sustancia de ensayo análoga a una base o un compuesto afín al agente selectivo, deben considerarse detenidamente sus propiedades, por ejemplo, cuando se sospeche que la sustancia de ensayo presenta toxicidad selectiva en las células mutantes y no mutantes. Así pues, habrá que confirmar la eficacia del sistema o agente de selección cuando se estudien sustancias de estructura afín a la del agente selectivo (8).

Se exponen las células en suspensión o el cultivo en monocapa a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, durante un periodo apropiado. Se realiza un subcultivo para determinar la citotoxicidad y dejar que se exprese el fenotipo antes de la selección de los mutantes (9)(10)(11)(12)(13). La citotoxicidad suele determinarse midiendo la eficacia relativa de clonado (supervivencia) o el crecimiento total relativo de los cultivos tras el periodo de tratamiento. Los cultivos tratados se mantienen en un medio de crecimiento durante un periodo de tiempo suficiente y específico para cada locus y tipo celular seleccionado, de manera que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas sea casi óptima. La frecuencia de mutantes se determina sembrando un número conocido de células en un medio con agente selectivo y en otro medio sin dicho agente para determinar la eficacia de clonado (viabilidad). Tras un periodo de incubación adecuado, se cuentan las colonias. Se compara el número de colonias mutantes en el medio selectivo y en el no selectivo para hallar la frecuencia de mutantes.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.4.1 **Preparación**

1.4.1.1 *Células*

Entre los diversos tipos de células apropiados para este ensayo se encuentran las de los subclones de L5178Y, CHO, CHO-ASS2, V79 y TK6. Deben emplearse tipos de células que presenten una sensibilidad probada a los mutágenos químicos, una elevada eficacia de clonado y una frecuencia estable de mutaciones espontáneas. Se comprobará la ausencia de contaminación por micoplasma. Se desecharán las células contaminadas.

El ensayo debe estar diseñado de manera que su sensibilidad y potencia estén predeterminadas. El número de células, cultivos y concentraciones de la sustancia de ensayo ha de reflejar dichos parámetros previamente definidos (14). En cada fase del ensayo, el número mínimo de células viables que sobrevivan al tratamiento deberá estar basado en la frecuencia de mutación espontánea. Por lo general, se emplea una cantidad de células al menos igual a diez veces el inverso de dicha frecuencia. Se recomienda, no obstante, utilizar un mínimo de 10^6 células. Para cerciorarse de que el ensayo proporciona resultados coherentes deberá disponerse de datos de controles históricos adecuados sobre el sistema celular utilizado.

1.4.1.2 *Medios y condiciones de cultivo*

Deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación apropiados (recipientes de cultivo, temperatura, concentración de CO_2 y humedad). Los medios han de elegirse con arreglo a los sistemas selectivos y los tipos celulares empleados en el ensayo. Es especialmente importante aplicar condiciones de cultivo que favorezcan un crecimiento celular óptimo durante el periodo de expresión y la capacidad de las células, mutantes y no mutantes, de formar colonias.

1.4.1.3 *Preparación de los cultivos*

Se multiplican células de cultivos madre, se siembran en el medio de cultivo y se incuban a 37°C . Antes de usar los cultivos en el ensayo, puede ser necesario lavarlos de las células mutantes que contengan.

1.4.1.4 *Activación metabólica*

Las células deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) o una mezcla de fenobarbital y β -naftoflavona (19)(20).

La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 1 al 10% v/v en el medio de ensayo final. La elección y condición de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase química de la sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial.

Son varias las técnicas -como la producción mediante ingeniería genética de líneas celulares que expresen enzimas activadoras específicas- que pueden proporcionar el potencial de activación endógena. La elección de las líneas celulares debe justificarse científicamente (por ej.: por la importancia de la isoenzima del citocromo P450 para el metabolismo de la sustancia de ensayo, etc.).

1.4.1.5 *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las células. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestran que es posible conservarlas.

1.4.2 **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1 *Disolvente o vehículo*

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las células y la actividad de S9. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua. Ésta podrá eliminarse añadiendo un tamiz molecular.

1.4.2.2 *Concentraciones de exposición*

Para determinar la concentración máxima de exposición deben considerarse al menos los siguientes criterios: citotoxicidad, solubilidad en el sistema de ensayo y variaciones del pH o la osmolalidad.

La citotoxicidad se determinará con y sin activación metabólica en el experimento principal mediante un indicador adecuado de la integridad y el crecimiento celular como la eficacia de clonado relativa (supervivencia) o el crecimiento total relativo. Puede ser útil determinar la citotoxicidad y la solubilidad en un experimento preliminar.

Se emplearán al menos cuatro concentraciones analizables. Si se produce citotoxicidad, la gama de concentraciones deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula, lo cual suele significar que la separación entre concentraciones corresponde a un factor comprendido entre 2 y $\sqrt{10}$. Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, debería producirse una supervivencia relativa (eficacia de clonado relativa) o un crecimiento total relativo aproximadamente del 10 al 20 %, pero no menos del 10 %. En el caso de sustancias escasamente citotóxicas, la concentración máxima de ensayo será la menor de estas tres: 5 mg/ml, 5 μ l/ml ó 0,01 M.

Las sustancias escasamente solubles deben ensayarse hasta concentraciones iguales o superiores al límite de solubilidad en las condiciones de cultivo. Ha de ponerse de manifiesto la insolubilidad en el medio de tratamiento final al que se exponen las células. Puede ser útil determinar la solubilidad al principio y al final del tratamiento, pues ésta puede variar durante la exposición en el sistema de ensayo debido a la presencia de células, S9, suero, etc. La insolubilidad puede detectarse por simple observación. El precipitado no debe interferir en la evaluación del resultado.

1.4.2.3 *Controles*

En todos los experimentos deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo, con y sin activación metabólica. Cuando se aplique ésta, la sustancia del control positivo ha de requerir activación para provocar una respuesta mutagénica.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para el control positivo:

Activación metabólica	Locus	Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Ausencia de activación metabólica exógena	HPRT	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (colonias grandes y pequeñas)	Metanosulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Presencia de activación metabólica exógena	HPRT	3-metilcolantreno	56-49-5
N-nitrosodimetilamina			62-75-9	200-549-8
7,12-dimetilbenzoantraceno			57-97-6	200-359-5
TK (colonias grandes y pequeñas)		Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
		monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
		3-metilcolantreno	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-nitrosodimetilamina (para grandes cantidades de S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5

Pueden utilizarse otras sustancias de referencia adecuadas para el control positivo, por ejemplo, la 5-bromo 2'-desoxiuridina [nº CAS 59-14-3, nº EINECS 200-415-9], si el laboratorio dispone de una base de datos al respecto. Deberá considerarse la utilización en dicho control de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Se realizarán controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo en el medio de tratamiento, y se tratarán de igual manera que los lotes tratados. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.4.3 **Procedimiento**

1.4.3.1 *Tratamiento con la sustancia de ensayo*

Las células en crecimiento se tratan con la sustancia de ensayo, en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. La duración de la exposición ha de ser suficiente (de tres a seis horas suelen bastar) y puede ampliarse hasta uno o varios ciclos celulares.

Pueden realizarse uno o dos cultivos con cada concentración de la sustancia de ensayo. En el caso de realizarse uno solo, se aumentará el número de concentraciones con el fin de disponer de suficientes cultivos para el análisis (por ejemplo, un mínimo de ocho concentraciones analizables). Deben realizarse dos cultivos para el control negativo (disolvente).

Las sustancias gaseosas o volátiles han de evaluarse con métodos adecuados tales como recipientes de cultivo herméticos, etc. (21)(22).

1.4.3.2 *Determinación de la supervivencia, la viabilidad y la frecuencia de mutantes*

Al término del periodo de exposición se lavan las células y se cultivan para determinar la supervivencia y dejar que se exprese el fenotipo mutante. La evaluación de la citotoxicidad suele empezarse después del periodo de tratamiento, determinando la eficacia de clonado relativa (supervivencia) o el crecimiento total relativo de los cultivos.

Cada locus necesita un tiempo mínimo determinado para que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas recientemente sea casi óptima (un mínimo de 6 a 8 días en el caso de HPRT y XPRT y de 2 días en el de TK). Las células se cultivan con y sin agente o agentes selectivos para determinar el número de mutantes y la eficacia de clonado, respectivamente. La viabilidad, que sirve para calcular la frecuencia de mutantes, empieza a determinarse al final del periodo de expresión colocando los cultivos en un medio no selectivo.

Si la sustancia de ensayo da un resultado positivo en el ensayo con L5178Y TK^{+/+}, deben medirse las colonias al menos en uno de los cultivos de ensayo (el de la concentración que dé resultados más positivos) y en los controles positivos y negativos. Si la sustancia de ensayo da un resultado negativo en el ensayo con L5178Y TK^{+/+}, deben medirse las colonias en los controles positivos y negativos. También pueden medirse las colonias en los estudios realizados con TK6TK^{+/+}.

2. RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos deben incluir la determinación de la citotoxicidad y la viabilidad, los recuentos de colonias y la frecuencia de mutantes en los cultivos tratados y en los controles. Si el resultado del ensayo con L5178Y TK^{+/−} es positivo, las colonias se cuentan distinguiendo las grandes de las pequeñas al menos en un cultivo tratado (con la concentración de sustancia de ensayo que dé los resultados más positivos) y en los controles positivos y negativos. Debe estudiarse detenidamente la naturaleza molecular y citogenética tanto de las colonias grandes como de las pequeñas (23)(24). En el ensayo TK^{+/−}, las colonias se cuentan distinguiendo las de crecimiento normal (grandes) de las de crecimiento lento (pequeñas) (25). Las células mutantes que han sufrido las lesiones genéticas más importantes requieren un tiempo de duplicación mayor, de manera que forman colonias pequeñas. Dichas lesiones suelen variar desde la pérdida de un gen entero hasta las aberraciones cromosómicas visibles en el cariotipo. La inducción de pequeñas colonias mutantes se ha asociado a sustancias que provocan aberraciones cromosómicas importantes (26). Las células mutantes menos afectadas crecen a una velocidad similar a la de las células parentales y forman colonias grandes.

Debe proporcionarse el índice de supervivencia (eficacia de clonado relativa) o el crecimiento total relativo. La frecuencia de mutantes se expresa como el número de células mutantes respecto al número de células supervivientes.

Se proporcionarán los datos relativos a cada cultivo y se resumirán en forma de tabla.

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. Es preciso confirmar los resultados negativos caso por caso. Los casos en que dicha confirmación no se considere necesaria deberán justificarse debidamente. En los experimentos complementarios de aquéllos que hayan dado resultados dudosos o negativos, se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentran la separación entre concentraciones y las condiciones de activación metabólica.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración o aumento reproducible de la frecuencia de mutantes, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo. El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

No se considerarán mutágenas en el sistema en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* indica que la sustancia de ensayo provoca mutaciones génicas en los cultivos de células de mamífero utilizadas. El elemento más significativo es la relación dosis-respuesta positiva y reproducible. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca mutaciones génicas en los cultivos de células de mamífero utilizadas.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo o disolvente;
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Células:

- tipo y procedencia;
- número de cultivos celulares;
- número de pases celulares, si procede;
- métodos de mantenimiento del cultivo celular, si procede;
- ausencia de micoplasma;

Condiciones del ensayo:

- fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos (datos relativos la citotoxicidad, límites de solubilidad, si se conocen, etc.);
- composición del medio y concentración de CO₂;
- concentración de la sustancia de ensayo;
- volumen de vehículo y de sustancia de ensayo añadida;
- temperatura de incubación;
- tiempo de incubación;
- duración del tratamiento;
- densidad celular durante el tratamiento;
- tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad;
- controles positivos y negativos;
- duración del periodo de expresión (con el número de células sembradas, subcultivos y pautas de nutrición, si procede);
- agentes selectivos;
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o ambiguos;
- métodos empleados para contar las células viables y las mutantes;
- definición del tamaño y el tipo de las colonias consideradas (incluidos, en su caso, los criterios de distinción de colonias “grandes” y “pequeñas”).

Resultados:

- signos de toxicidad;
- signos de precipitación;
- datos sobre el pH y la osmolalidad durante la exposición a la sustancia de ensayo, si se han determinado;
- tamaño de las colonias contadas, al menos en los controles positivos y negativos;
- capacidad del laboratorio para detectar mutantes en colonias pequeñas con el sistema L5178Y TK^{+/−}, en su caso;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos, si se han realizado;
- datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo;
- datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar;
- frecuencia de mutantes.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. y Tindall, K.R. (eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
2. Chu, E.H.Y. y Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
3. Liber, H.L. y Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467-485.
4. Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. y Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394-403.
5. Aaron, C.S. y Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.
6. Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. y Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.
7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. y Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.
8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. y Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, 225-251.
9. Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. y Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.
10. Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. y Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.
11. Liber, H.L., Yandell, D.W y Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.
12. Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. y Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.
13. Turner, N.T., Batson, A.G. y Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK^{+/+} - TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. En: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
14. Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. y Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. En: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. y Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

16. Ames, B.N., McCann, J. y Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
17. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. y Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/+} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, 61-108.
18. Maron, D.M. y Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
19. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. y Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. y Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. En: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. y Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
21. Krahn, D.F., Barsky, F.C. y McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. En: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
22. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. y Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
23. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. y Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 51-55.
24. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. y Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) Mutants of L5178Y/TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, 161-174.
25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. y Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. *Mutation Res.*, 229, 89-102.
26. Moore, M.M. y Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/+}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, 609-614.

B. 18

LESIÓN Y REPARACIÓN DE DNA — SÍNTESIS DE DNA NO PROGRAMADA — CÉLULAS DE MAMÍFEROS IN VITRO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El ensayo de síntesis no programada de DNA (UDS) mide la síntesis de reparación del DNA tras escisión y eliminación de un fragmento de DNA que contiene la región lesionada por agentes químicos y físicos. Se basa en la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) al DNA de células de mamífero que no se encuentren en la fase S del ciclo celular. Es posible determinar la captación de $^3\text{H-TdR}$ mediante el examen del DNA procedente de células tratadas por autorradiografía o recuento en centelleo líquido (LSC). Las células de mamífero en cultivo, salvo si se utilizan hepatocitos primarios de rata, se tratan con la sustancia objeto de estudio con un sistema de activación metabólica exógeno y sin él. También es posible determinar la UDS por métodos *in vivo*.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Las sustancias químicas analizadas y las de control o referencia se prepararán en un medio de crecimiento, o se disolverán o suspenderán en vehículos apropiados, para diluirse luego aún más en un medio de cultivo antes de utilizarse en el ensayo. La concentración final del vehículo no debe influir en la viabilidad celular.

Pueden utilizarse para este ensayo cultivos primarios de hepatocitos de rata, linfocitos humanos o líneas celulares establecidas (p. ej., fibroblastos humanos diploides).

Las células se expondrán a la sustancia química estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado.

Condiciones del ensayo

Número de cultivos

Son necesarios, para cada punto experimental, al menos dos cultivos celulares para la autorradiografía y seis (o menos, si está justificado científicamente) para el recuento en centelleo líquido.

Uso de testigos negativos y positivos

Se incluirán en cada experimento controles positivos y negativos (no tratados, con vehículo o ambos) simultáneos, con activación metabólica y sin ella.

Son ejemplos de controles positivos para la prueba con hepatocitos de ratas el 7,12-dimetilbenzantraceno (7,12-DMBA) o el 2-acetilaminfluoreno (2-AAF). En el caso de líneas celulares establecidas, el 4-NQO (4-nitroquinolina-N-óxido) es un ejemplo de control positivo para los ensayos por autorradiografía y LSC realizados sin activación metabólica; cuando se emplean sistemas de activación metabólica, un ejemplo de compuesto de control positivo sería la N-dimetilnitrosamina.

Concentraciones de exposición

Se utilizará una gama de concentraciones de la sustancia estudiada que permita determinar la respuesta de modo óptimo. La concentración máxima debe producir ciertos efectos citotóxicos. Los compuestos relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Células

Para mantener los cultivos, se utilizarán medios de crecimiento, concentraciones de CO₂ y temperatura y humedad apropiados. Las líneas celulares establecidas se examinarán periódicamente para comprobar si existe contaminación por mycoplasma.

Activación metabólica

En los cultivos primarios de hepatocitos no se utiliza ningún sistema de activación metabólica. Por su parte, las líneas celulares establecidas y los linfocitos se exponen a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado.

Procedimiento

Preparación de los cultivos

Líneas celulares establecidas, derivadas de cultivos madre (p. ej., por tripainización o agitación) se siembran con la densidad adecuada en recipientes de cultivo y se incuban a 37° C.

Se establecen cultivos a corto plazo de hepatocitos de rata permitiendo a hepatocitos recién disociados en un medio apropiado fijarse a la superficie de crecimiento.

Los cultivos de linfocitos humanos se establecen por medio de técnicas apropiadas.

Tratamiento de los cultivos con la sustancia estudiada

Hepatocitos primarios de rata

Los hepatocitos de ratas recién aisladas se tratan con la sustancia estudiada, en un medio que contenga ³H-TdR, durante un período de tiempo apropiado. Al final de éste, se eliminará el medio, y se aclararán, fijarán y secarán las células. Las preparaciones se sumergen en una emulsión autorradiográfica (también cabe utilizar película fotográfica), se exponen, se revelan, se tiñen y se cuentan.

Líneas celulares establecidas y linfocitos

Técnicas autorradiográficas: Los cultivos celulares se exponen a la sustancia estudiada durante períodos de tiempo adecuados, y se tratan después con ³H-TdR. El plazo de exposición dependerá de la naturaleza de la sustancia, de la actividad del sistema metabólico y del tipo de células. Para apreciar el pico de UDS, se añadirá ³H-TdR al mismo tiempo que la sustancia analizada o en los pocos minutos posteriores a su exposición. La elección de una u otra de estas técnicas vendrá determinada por posibles interacciones entre la sustancia y la ³H-TdR. Para distinguir esta última se utiliza, por ejemplo, un medio deficitario en arginina, un contenido de suero bajo o la adición de hidroxuira al medio de cultivo.

Determinaciones de la UDS por LSC: Antes de proceder al tratamiento con la sustancia objeto de estudio, se bloqueará la entrada de las células en la fase S del modo antes indicado; a continuación, se expone a las células a la sustancia tal como se describe para la autorradiografía. Al final del período de incubación, se extrae el DNA de las células y se determinan el contenido total de DNA y el grado de incorporación de ³H-TdR.

Hay que señalar que cuando se utilicen linfocitos humanos en las técnicas expuestas no es necesario suprimir la replicación semiconservadora de DNA en cultivos no estimulados.

Análisis

Determinaciones autorradiográficas

Para determinar la UDS en células en cultivo, no se cuentan los núcleos en fase S. Se contarán por lo menos 50 células por concentración. Las preparaciones recibirán un código antes del recuento. Se contarán en cada una de ellas varios campos, elegidos al azar y lo bastante alejados entre sí. Se determinará la cantidad de ^3H -TdR incorporada al citoplasma mediante el recuento de tres superficies del tamaño del núcleo en el citoplasma de cada célula contada.

Determinación por LSC

En las determinaciones de la UDS por LSC debe utilizarse un número adecuado de cultivos para cada concentración y en los controles.

Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

2.1. Determinaciones autorradiográficas

Se registrarán por separado la cantidad de ^3H -TdR incorporada al citoplasma y el número de granos encontrados sobre el núcleo celular.

Pueden utilizarse la media, la mediana y el modo para describir la distribución de la cantidad de ^3H -TdR incorporada en el citoplasma, así como el número de granos por núcleo.

2.2. Determinaciones por LSC

Para las determinaciones por LSC, se indicará la incorporación de ^3H -TdR en forma de dpm/ μg de DNA. Puede utilizarse la media de dmp/ μg de DNA, con su desviación estándar, para describir la distribución de la incorporación.

Los datos se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos el ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- células utilizadas, densidad y número de pases en el momento del tratamiento, número de cultivos celulares
- métodos utilizados para el mantenimiento de los cultivos celulares, incluidos medio, temperatura y concentración de CO_2
- sustancia estudiada, vehículo, concentraciones y justificación de la elección de las concentraciones empleadas en el ensayo
- detalles sobre los sistemas de activación metabólica
- programa de tratamiento
- controles positivos y negativos

- técnica autorradiográfica utilizada
- métodos empleados para bloquear la entrada de las células en la fase S
- técnicas utilizadas para extraer el DNA y determinar la cantidad total de DNA en la determinación por LSC
- relación dosis-respuesta, si es posible
- evaluación estadística
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**
Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**
Véase Introducción general, Parte B.

B. 19

ENSAYO IN VITRO DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El ensayo de intercambio de cromátidas hermanas (SCE) es una prueba a corto plazo encaminada a descubrir intercambios recíprocos de DNA entre 2 cromátidas hermanas de un cromosoma de desdoblamiento. Los SCE representan el intercambio recíproco de productos de replicación del DNA en loci aparentemente homólogos. Es probable que el proceso de intercambio comprenda la rotura y la reunión del DNA, aunque se sabe poco sobre su base molecular. Para descubrir los SCE, es necesario poder marcar de forma diferente las cromátidas hermanas, cosa que se consigue mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) al DNA cromosómico durante dos ciclos celulares.

Se exponen células de mamífero *in vitro* a la sustancia objeto de estudio en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena de mamífero, si procede, y se cultivan durante dos ciclos de replicación en un medio que contenga BrdU. Después del tratamiento con un inhibidor del huso (p. ej., colchicina) para acumular las células en fase de mitosis de tipo metafásico (c-metáfase), se recolectan las células y se realizan preparaciones de cromosomas.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

- Pueden utilizarse en el ensayo cultivos primarios (linfocitos humanos) o líneas celulares establecidas (p. ej., células ováricas de hámster chino). Las líneas celulares se controlarán en busca de una posible contaminación por mycoplasma.
- Se utilizarán medios de cultivo y condiciones de incubación (p. ej., temperatura, recipientes de cultivo, concentración de CO₂ y humedad) adecuados.
- Las sustancias estudiadas pueden prepararse en medios de cultivo, o disolverse o suspenderse en vehículos apropiados, antes del tratamiento de las células. La concentración final de un vehículo en el sistema de cultivo no debe influir de modo notable en la viabilidad ni en el índice de crecimiento de las células, y los efectos sobre la frecuencia de SCE se controlarán con ayuda de un control del disolvente.
- Las células se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena de mamífero. Por otro lado, cuando se utilicen tipos de células con actividad metabólica intrínseca, el grado y la naturaleza de la actividad deben ser apropiados para la clase química objeto de estudio.

Condiciones del ensayo

Número de cultivos

Para cada ensayo, se utilizarán dos cultivos separados, por lo menos.

Uso de controles positivos y negativos

Deben incluirse en cada experimento controles positivos en los que se utilicen una sustancia con acción directa y otra que precise activación metabólica; también ha de utilizarse un control para el vehículo.

A continuación facilitamos ejemplos de sustancias que pueden utilizarse como controles positivos:

- compuesto de acción directa: etilmetanosulfonato
- compuesto de acción indirecta: ciclofosfamida.

En caso oportuno, puede incluirse un control positivo complementario de la misma clase química que la sustancia estudiada.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán al menos tres concentraciones de la sustancia objeto de estudio, escalonadas debidamente. La concentración máxima producirá un efecto tóxico significativo, pero no impedirá una replicación celular adecuada. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad por métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Procedimiento

Preparación de los cultivos

Líneas celulares establecidas, derivadas de cultivos madre (p. ej., por tripsinización o agitación), se siembran con la densidad adecuada en recipientes de cultivo y se incuban a 37° C. En los cultivos de una sola capa celular, el número de células por recipiente de cultivo debe ajustarse de modo que los cultivos no confluyan en más del 50 % en el momento de la recogida. También es posible utilizar las células en forma de un cultivo en suspensión. Los cultivos de linfocitos humanos se preparan a partir de sangre heparinizada por medio de técnicas apropiadas, y se incuban a 37° C.

Tratamiento

Se expone a células en fase de crecimiento exponencial a la sustancia analizada durante un período de tiempo apropiado; en la mayoría de los casos pueden bastar una o dos horas, pero en determinadas circunstancias puede prolongarse el período de tratamiento hasta abarcar dos ciclos celulares completos. Las células sin actividad metabólica intrínseca deben exponerse a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado. Al final del período de exposición, se lavan las células hasta eliminar la sustancia estudiada y se cultivan en presencia de BrdU durante dos ciclos de replicación. Otro método consiste en exponer simultáneamente las células a la sustancia y BrdU durante dos ciclos celulares completos.

Los cultivos de linfocitos humanos se tratan mientras se encuentran en un estado semisincrónico.

Las células se examinan en su segunda división tras el tratamiento, con lo que se garantiza la exposición de las fases más sensibles del ciclo celular a la sustancia estudiada. Todos los cultivos a los que se añade BrdU se manipularán en la oscuridad o con iluminación débil de lámparas incandescentes hasta la recolección de las células, a fin de reducir la fotólisis del DNA que contenga BrdU.

Recolección de las células

Los cultivos celulares se tratan con un inhibidor del huso (p. ej., colchicina) de 1 a 4 horas antes de la recolección. Cada cultivo se recolecta y trata por separado para la preparación de los cromosomas.

Preparación y tñido de los cromosomas

Las preparaciones de cromosomas se realizan por métodos citogenéticos estándar. Existen varias técnicas para tñirlos de forma que se aprecien los SCE (p. ej., el método de fluorescencia con Giemsa).

Análisis

El número de células analizadas dependerá de la frecuencia espontánea de control de SCE. Por lo general, se analizan al menos 25 metafases bien escalonadas por cultivo para contar los SCE. Las preparaciones reciben un código antes del análisis. En linfocitos humanos, sólo se analizan las metafases que contienen 46 centrómeros. En las líneas celulares establecidas, sólo se analizan las metafases que contienen ± 2 centrómeros del número modal. Se precisará si una inversión del marcado en el centrómero se considera SCE. Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas. El número de SCE para cada metafase y el de SCE por cromosoma han de facilitarse por separado para todos los cultivos tratados y de control. Los resultados se analizarán por métodos estadísticos adecuados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- células utilizadas, métodos de mantenimiento del cultivo celular
- condiciones del ensayo: composición de los medios, concentración de CO₂, concentración de la sustancia estudiada, vehículo empleado, temperatura de incubación, período de tratamiento, inhibidor del huso utilizado, su concentración y duración del tratamiento con él, tipo de sistema de activación de mamífero utilizado, controles positivos y negativos
- número de cultivos celulares por ensayo
- detalles de la técnica utilizada para la preparación de las extensiones
- número de metafases analizadas (datos facilitados por separado para cada cultivo)
- número medio de SCE por célula y por cromosoma (datos facilitados por separado para cada cultivo)
- criterio de recuento de los SCE
- justificación de la elección de las dosis
- relación dosis-respuesta, si es posible
- evaluación estadística
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B. 20

ENSAYO DE LETALIDAD RECESIVA LIGADA AL SEXO EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La prueba de letalidad recesiva ligada al sexo (SLRL) practicada con *Drosophila melanogaster* descubre la aparición de mutaciones (lo mismo mutaciones puntuales que pequeñas deleciones) en la línea germinal del insecto. Se trata de un análisis de mutación capaz de descubrir mutaciones en unos 800 loci de cromosoma X, lo que supone alrededor del 80 % del total de loci existentes. El cromosoma X supone aproximadamente una quinta parte del genoma haploide completo.

Las mutaciones del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* se expresan fenotípicamente en los machos portadores del gen mutante. Cuando la mutación es letal en el estado hemicígote, se deduce su presencia por la falta de uno de los grupos de descendencia masculina de los dos producidos normalmente por una hembra heterocigota. La prueba SLRL aprovecha estas circunstancias por medio de cromosomas marcados especialmente y con reordenaciones de su estructura.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Animales de experimentación

Pueden utilizarse machos de un linaje de tipo salvaje bien definido, y hembras de linaje Muller-5. También cabe emplear otros linajes de hembras debidamente marcadas con cromosomas X invertidos de manera múltiple.

Sustancia objeto de estudio

Las sustancias estudiadas se disuelven en agua. Las que sean insolubles en agua pueden disolverse o suspenderse en vehículos apropiados (p. ej., una mezcla de etanol y Tween-60 u 80), para diluirse luego en agua o solución salina antes de la administración. Se evitará el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo.

Número de animales

Se determinarán previamente la sensibilidad y la potencia de la prueba. La frecuencia de mutantes espontáneos observada en el control apropiado influirá intensamente en el número de cromosomas tratados que deba analizarse.

Vía de administración

La exposición puede ser oral, por inyección o por exposición a gases o vapores. La sustancia objeto de estudio puede administrarse en una solución azucarada. Cuando sea necesario, pueden disolverse las sustancias en una solución de ClNa al 0,7% e inyectarlas así en el tórax o el abdomen.

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán controles negativos (vehículo) y positivos. No obstante, si el laboratorio dispone de datos de controles publicados adecuados, no son necesarios controles simultáneos.

Niveles de exposición

Se utilizarán tres niveles de exposición. Para una evaluación preliminar, puede utilizarse un solo nivel de exposición de la sustancia analizada, que corresponderá a la concentración máxima tolerada o a la que produzca ciertos signos de toxicidad. Cuando se trate de sustancias atóxicas, ha de utilizarse la exposición en la concentración máxima posible.

Procedimiento

Se tratan machos de fenotipo salvaje (de tres a cinco días de edad) con la sustancia objeto de estudio y se aparean individualmente con varias hembras vírgenes del linaje Muller-5, o de otro debidamente marcado (con cromosomas invertidos de manera múltiple). Las hembras se sustituyen por vírgenes nuevas cada dos o tres días para cubrir el ciclo germinal completo. Se examina luego la descendencia de estas hembras para apreciar los efectos letales correspondientes a los efectos sobre el esperma maduro, las espermátidas en estadios precoces, medios y tardíos, los espermocitos y los espermatogonios en el momento del tratamiento.

Las hembras F₁ heterocigotas procedentes de los cruces anteriores se aparean individualmente (es decir, una hembra por vial) con sus hermanos. En la generación F₂, se examina cada cultivo para descubrir la ausencia de machos del tipo salvaje. Si un cultivo parece proceder de una hembra F₁ portadora de un gen letal en el cromosoma X paterno (es decir, no se observa ningún macho portador del cromosoma tratado), se pondrán a prueba las hijas de esta hembra que presenten el mismo genotipo para comprobar si la letalidad se repite en la generación siguiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que se consignen el número de cromosomas estudiados, el de machos infértiles y el de cromosomas letales en cada concentración de exposición y en cada período de apareamiento, para cada macho tratado. Se indicará el número de grupos de tamaños diferentes por macho. Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

Se utilizarán métodos estadísticos apropiados para evaluar el ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo. El reagrupamiento de genes letales recesivos procedentes de un solo macho se tendrá en cuenta y se evaluará por un método estadístico adecuado.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- linajes o cepas de *Drosophila* empleados, edad de los insectos, número de machos tratados, número de machos estériles, número de cultivos F₂ establecidos, número de cultivos F₂ sin progenie, número de cromosomas portadores de un gen letal encontrado en cada estadio de la célula germinal
- criterios adoptados para determinar el tamaño de los grupos tratados
- condiciones de la prueba: descripción detallada del programa de tratamiento y muestreo, niveles de exposición, datos de toxicidad, controles negativos (disolvente) y positivos si procede
- criterios de recuento de las mutaciones letales
- relación exposición/efecto, si es posible
- evaluación de los datos
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B. 21

ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Es posible utilizar sistemas de cultivo de células de mamífero para descubrir modificaciones fenotípicas *in vitro* inducidas por sustancias químicas asociadas con transformación maligna *in vivo*. Entre las células de uso más frecuente figuran C3H10T^{1/2}, 3T3, SHE, rata Fisher; las pruebas se basan en modificaciones de la morfología celular, la formación de focos o modificaciones vinculadas con el crecimiento o no en agar semisólido. Existen sistemas, empleados con menor frecuencia, que ponen de manifiesto otras alteraciones fisiológicas o morfológicas en las células tras exposición a sustancias químicas carcinogénicas. Ninguno de los criterios analizados en estas pruebas *in vitro* tiene una relación de mecanismo establecida con el cáncer. Algunos de los sistemas de prueba son capaces de descubrir promotores tumorales. Puede determinarse la citotoxicidad averiguando el efecto de la sustancia estudiada sobre la capacidad de formación de colonias (eficacia de clonado) o los índices de crecimiento de los cultivos. La determinación de la citotoxicidad tiene por objeto establecer si la exposición a la sustancia analizada ha sido toxicológicamente significativa, pero no permite calcular la frecuencia de transformaciones en todas las pruebas, dado que en algunas de éstas pueden ser necesarias una incubación prolongada, una nueva siembra o ambas.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Células

Según la prueba de transformación que se realice, pueden utilizarse líneas celulares o células primarias diversas. El investigador se encargará de que las células que se empleen presenten la modificación fenotípica apropiada tras exposición a sustancias carcinogénicas conocidas, y de que la fiabilidad y la validez de la prueba efectuada en su laboratorio estén contrastadas por datos documentados.

Medio

Se utilizarán medios y condiciones experimentales apropiados para la prueba de transformación elegida.

Sustancia objeto de estudio

Las sustancias puestas a prueba pueden prepararse en medios de cultivo, disolverse o suspenderse en vehículos apropiados antes de tratar las células. La concentración final del vehículo en el medio de cultivo no influirá en la viabilidad de las células, el índice de crecimiento ni en la incidencia de transformación.

Actividad metabólica

Las células se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica de mamífero apropiado. Cuando se utilicen tipos celulares con actividad metabólica intrínseca, deberá saberse si la naturaleza de la actividad es apropiada para la clase química analizada.

Condiciones del ensayo

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán en cada experimento controles positivos a base de una sustancia de acción directa y otra que precise activación metabólica; también se utilizará un control negativo (vehículo).

A continuación se ofrecen ejemplos de sustancias que pueden emplearse como controles positivos:

- Compuestos de acción directa:
 - etilmentanosulfonato
 - β -propiolactona
- Compuestos que precisan activación metabólica:
 - 2-acetilaminofluoreno
 - 4-dimetilaminoazobenceno
 - 7,12-dimetilbenzantraceno

Cuando se juzgue oportuno, se incluirá un control positivo complementario perteneciente a la misma clase química que la sustancia estudiada.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán varias concentraciones de la sustancia objeto de estudio, que producirán un efecto tóxico acorde con su potencia; así, la concentración máxima provocará una supervivencia escasa, mientras que la supervivencia con la concentración mínima será aproximadamente igual a la encontrada en el control negativo. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad por medio de métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta de la sustancia estudiada se determinará en cada caso.

Procedimiento

Las células deben exponerse durante un período de tiempo adecuado, que dependerá del sistema celular utilizado; por tanto, quizá sea necesario un nuevo tratamiento, acompañado de un cambio de medio (y, en caso preciso, de una nueva mezcla de activación metabólica), si la exposición es prolongada. Las células carentes de actividad metabólica intrínseca suficiente se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado. Al final del período de exposición, se lavan las células hasta eliminar la sustancia analizada y se cultivan en condiciones que permitan la aparición del fenotipo transformado en estudio; se determina también la incidencia de esta transformación. Todos los resultados se confirman en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas que recogerán datos diversos según el método que se utilice, como, por ejemplo, recuentos por placa, placas positivas o número de células transformadas. Cuando proceda, se expresará el índice de supervivencia en porcentaje de los índices de control y frecuencia de transformación a modo del número de células transformadas frente al de supervivientes. Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- tipo de célula utilizado, número de cultivos celulares, métodos de mantenimiento de los cultivos celulares
- condiciones del ensayo; concentración de la sustancia estudiada, vehículo utilizado, período de incubación, duración y frecuencia del tratamiento, densidad celular durante el tratamiento, tipo de sistema de activación metabólica exógena utilizado, controles positivos y negativos, especificación del fenotipo estudiado, sistema selectivo empleado (si procede), justificación de la elección de las dosis

- método utilizado para contar las células viables y transformadas
- evaluación estadística
- discusión de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 22

ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La letalidad dominante provoca la muerte del embrión o feto. Su inducción por exposición a una sustancia química indica que ésta ha alterado el tejido embrionario de la especie estudiada. Se admite generalmente que la letalidad dominante se debe a una lesión cromosómica (anomalías estructurales y numéricas). Si los animales tratados son hembras, la muerte del embrión también puede deberse a efectos tóxicos.

En general, los machos se exponen a la sustancia objeto de estudio y se aparean con hembras vírgenes no tratadas. Es posible investigar por separado los distintos estadios de las células embrionarias gracias al empleo de intervalos de apareamiento sucesivos. Un número de implantes muertos por hembra, en el grupo tratado, superior al observado en el grupo de control, es reflejo de las pérdidas tras la implantación. Por otro lado, es posible calcular las pérdidas antes de ella mediante recuento de los cuerpos lúteos, o por comparación entre número total de implantes por hembra en los grupos tratados y los de control. El efecto total de letalidad dominante es igual a la suma de las pérdidas antes y después de la implantación. El cálculo de tal efecto se basa en la comparación del número de implantes vivos por hembra, en el grupo de prueba, en relación con el registrado para el grupo de control. Una reducción del número de implantes en determinados intervalos puede deberse a destrucción de células (es decir, de espermatoцитos, espermatoгонios o ambos).

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Cuando sea posible, las sustancias objeto de estudio se disolverán o suspenderán en solución salina isotónica. Las sustancias químicas insolubles en agua pueden disolverse o suspenderse en vehículos apropiados. El vehículo utilizado no alterará el compuesto estudiado ni producirá efectos tóxicos. Deben emplearse preparaciones recientes de la sustancia objeto de estudio.

Condiciones del ensayo

Vía de administración

En general, la sustancia estudiada sólo debe administrarse una vez, aunque cabe utilizar un programa de tratamiento reiterado si lo aconseja la información toxicológica disponible. Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal. Pueden ser apropiadas otras vías de administración.

Animales de experimentación

Se recomienda utilizar ratas o ratones, jóvenes y en plena madurez sexual, que se distribuirán al azar para formar grupos de tratamiento y de control.

Número y sexo

Se utilizará un número apropiado de machos tratados, teniendo en cuenta la frecuencia espontánea del carácter biológico evaluado según la cepa empleada. El número elegido se basará en la sensibilidad de detección y el grado de significación, determinados previamente. Por ejemplo, en un experimento tipo, el número de machos en cada grupo posológico deberá ser suficiente para obtener alrededor de 30 a 50 hembras grávidas por período de apareamiento.

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán simultáneamente en cada experimento controles positivos y negativos (vehículos). Cuando se disponga de resultados aceptables obtenidos con controles positivos en experimentos recientes en el mismo laboratorio, podrán emplearse en lugar de un control positivo simultáneo. En lo que respecta a las sustancias de control positivas, se utilizará una dosis baja apropiada (p. ej., MMS, intraperitonealmente, 10 mg/kg) para demostrar la sensibilidad de la prueba.

Dosis

Normalmente, se utilizan tres niveles posológicos. La dosis alta producirá signos de toxicidad o reducirá la fecundidad de los animales tratados. En determinados casos, puede bastar un solo nivel posológico alto.

Prueba de límite

Las sustancias atóxicas se estudian en concentración de 5 g/kg en caso de administración única, y de 1 g/kg/día en caso de administración reiterada.

Procedimiento

Hay varios esquemas de tratamiento posibles. El método más frecuente es el de la administración única, pero pueden utilizarse otros.

Cada macho se apareará de forma secuencial con 1 ó 2 hembras vírgenes no tratadas, a intervalos de tiempo apropiados tras el tratamiento. Las hembras se mantendrán con los machos durante al menos un ciclo estral completo o hasta que se compruebe el apareamiento por la presencia de esperma en la vagina o por la existencia de tapón vaginal.

El número de apareamientos tras el tratamiento dependerá del programa de tratamiento, y garantizará la obtención de muestras de todos los estadios de células embrionarias tras el tratamiento.

Las hembras se sacrifican en la segunda mitad de la gestación para examinar el contenido de su útero y determinar el número de implantes vivos y muertos. Pueden inspeccionarse los ovarios para averiguar el número de cuerpos lúteos.

2.

RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de machos, el de hembras grávidas y el de hembras no grávidas. Se facilitarán por separado los resultados de cada apareamiento, incluida la identidad de cada macho y hembra. Se recogerán, para cada hembra, la semana de apareamiento y la dosis recibida por los machos, así como las frecuencias de implantes vivos y muertos.

El cálculo del efecto total de la letalidad dominante se basa en la comparación del número de implantes vivos por hembra en el grupo tratado y en el de control. Se analiza la relación entre implantes vivos y muertos en el grupo tratado, en comparación con la obtenida en el grupo de control, para deducir las pérdidas tras la implantación.

Si se registran los datos en forma de muertes precoces y tardías, se indicará claramente esta diferencia en las tablas. Si se calculan las pérdidas antes de la implantación, debe informarse de ellas. Tales pérdidas pueden calcularse a modo de diferencias entre el número de cuerpos lúteos y el de implantes, o de reducción del número medio de implantes por hembra en relación con los apareamientos de control.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. **INFORME**

3.1. **Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, edad y pesos de los animales utilizados, número de animales de cada sexo en los grupos tratados y controles
- sustancia estudiada, vehículo, niveles posológicos ensayados y justificación de su elección, controles negativos y positivos, datos relativos a la toxicidad
- vía y programa de tratamiento
- programa de apareamiento
- método utilizado para comprobar el apareamiento
- momento del sacrificio
- criterios de recuento de los efectos de la letalidad dominante
- relación dosis-respuesta, si es posible
- evaluación estadística
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B.23. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOGONIAS

DE MAMÍFERO

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 483 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero (1997).

1.1 INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero tiene por objeto detectar sustancias que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en espermatogonias de mamífero (1)(2)(3)(4)(5). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. El presente método no está pensado para detectar aberraciones numéricas ni se emplea habitualmente con ese fin. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas.

El presente ensayo detecta alteraciones cromosómicas en las células germinales de las espermatogonias y debería, por tanto, permitir prever la inducción de mutaciones hereditarias en las células germinales.

El ensayo suele realizarse con roedores; es un ensayo citogenético *in vivo* que detecta aberraciones cromosómicas en las mitosis de las espermatogonias. El presente método no se refiere a otras células diana.

Para detectar aberraciones cromatídicas en las espermatogonias es preciso analizar la primera mitosis celular después del tratamiento, antes de que las lesiones desaparezcan en las divisiones celulares siguientes. Puede obtenerse información adicional del análisis de los cromosomas meióticos de células madre de espermatogonias tratadas, para detectar aberraciones cromosómicas de la diacinesis a la metafase I cuando las células tratadas se convierten en espermatoцитos.

El presente ensayo *in vivo* está diseñado para determinar si los mutágenos de las células somáticas también son activos en las células germinales. Asimismo, está indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN.

Los testículos contienen varias generaciones de espermatogonias, que presentan distinta sensibilidad al tratamiento químico. Por tanto, las aberraciones detectadas corresponden a una respuesta global de las poblaciones de espermatogonias tratadas, en las que predominan las células diferenciadas, que son las más numerosas. Según su localización en el testículo y debido a la barrera física y fisiológica de las células de Sertoli, así como a la barrera entre la sangre y el testículo, algunas generaciones de espermatogonias están expuestas a la circulación general y otras no.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2 DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o en la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Aberración numérica: número de cromosomas distinto del número normal propio de los animales empleados.

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide (n) superior al diploide ($3n$, $4n$, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada y se sacrifican a intervalos apropiados tras el tratamiento. Antes de sacrificarlos, se les administra una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o Colcemid®). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células germinales y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromosómicas.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Preparación

1.4.1.1 Selección de la especie animal

Si bien suelen emplearse hámsters chinos y ratones machos, pueden utilizarse machos de otra especie de mamíferos apropiada. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio.

1.4.1.2 Alojamiento y alimentación de los animales

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60 %.

1.4.1.3 Preparación de los animales

Se reparten al azar machos adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días antes de empezar el estudio.

1.4.1.4 *Preparación de las dosis*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestran que es posible conservarlas.

1.4.2 **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1 *Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2 *Controles*

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían producirse aberraciones cromosómicas estructurales en las espermatogonias *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto al nivel de fondo.

Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia empleada en el control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
Ciclohexilamina	108-91-8	203-629-0
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Monómero de acrilamida	79-06-1	201-173-7
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con aberraciones cromosómicas aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 Número de animales

Los lotes tratados y los controles han de estar compuestos al menos por cinco machos analizables cada uno.

1.5.2 Pauta de tratamiento

Las sustancias de ensayo se administran preferiblemente una o dos veces (uno o dos tratamientos), aunque también puede dividirse la dosis -por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo- con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades. Si se siguen otras pautas debe justificarse científicamente.

En el lote al que se ha administrado la dosis máxima se toman dos muestras tras el tratamiento. Dado que la sustancia de ensayo puede afectar a la cinética del ciclo celular, suele tomarse la primera muestra hacia las 24 horas y la segunda, unas 48 horas después del tratamiento. En los demás lotes se toma una muestra transcurridas 24 horas o un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular desde el tratamiento, salvo que se conozca otro periodo de muestreo más adecuado para detectar los efectos estudiados (6).

Pueden seguirse otros periodos de muestreo. Por ejemplo, en el caso de sustancias que puedan provocar la pérdida de cromosomas o tener efectos independientes de la fase S, pueden estar indicados periodos de muestreo más cortos (1).

Debe valorarse caso por caso la pertinencia de una pauta de administración repetida. Si se aplica una pauta de ese tipo, los animales deben sacrificarse 24 horas (1,5 veces la duración del ciclo celular) después de la última administración. Cuando proceda, pueden aplicarse periodos de muestreo complementarios.

Antes de sacrificar los animales, se les inyecta por vía intraperitoneal una dosis adecuada de una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se extraen las muestras transcurrido un plazo oportuno, que en el caso de los ratones es de unas 3 a 5 horas y en el de los hámsters chinos, de unas 4 a 5 horas.

1.5.3 Dosis

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa y protocolo de tratamiento que el estudio principal (7). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el último período de muestreo se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por dosis máxima la que produzca tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo resultaría probablemente letal.

Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en las espermatogonias (por ejemplo, disminución de la proporción entre el número de mitosis de las espermatogonias y el número de metafases I y II de la meiosis; la disminución no ha de ser superior al 50 %).

1.5.4 **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2000 mg/kg de peso corporal/día administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5 **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a éste. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6 **Preparación de los cromosomas**

Inmediatamente después del sacrificio, se preparan suspensiones con células de uno o ambos testículos, se tratan con una solución hipotónica y se fijan. A continuación, se distribuyen las células en portaobjetos y se tiñen.

1.5.7 **Análisis**

Deben analizarse al menos 100 metafases bien extendidas de cada animal (es decir, un mínimo de 500 metafases por lote). La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones. Antes de analizarlos al microscopio, se asigna un código independiente a cada portaobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de fijación provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, las células analizadas deben contener un número de centrómeros igual a $2n \pm 2$.

2. **RESULTADOS**

2.1 **TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS**

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Se determinará en cada animal la cantidad de células con aberraciones cromosómicas estructurales y el número de aberraciones cromosómicas por célula. Se hará una relación de los distintos tipos, el número y la frecuencia de dichas aberraciones en los lotes tratados y los controles. Los gaps se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones.

Si se observan tanto mitosis como meiosis, se determinará la relación entre las mitosis de espermatogonias y la primera y segunda metafases meióticas en una muestra de 100 células en división por cada animal de los lotes tratados y de los controles negativos, con el fin de establecer si ha habido citotoxicidad. Si se observan mitosis únicamente, se determinará el índice mitótico al menos en 1000 células por animal.

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento de la proporción de células con aberraciones cromosómicas relacionado con la dosis, claro aumento del número de células que presentan aberraciones en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (8). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas estructurales en las células germinales de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en las células germinales de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos lleguen al tejido diana.

3.

INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo;
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas;
- número y edad de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.;
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

- datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo;
- fundamento de la selección de la dosis;
- fundamento de la elección de la vía de administración;
- preparación de la sustancia de ensayo;
- administración de la sustancia de ensayo;
- fundamento de la elección del momento del sacrificio;
- conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede;
- calidad de los alimentos y el agua;
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras;
- métodos de determinación de la toxicidad;
- sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración del tratamiento;
- métodos de preparación de los portaobjetos;
- criterios de recuento de las aberraciones;
- número de células analizadas por animal;
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- signos de toxicidad;
- índice mitótico;
- proporción entre el número de mitosis de espermatogonias y el número de metafases I y II de la meiosis;
- tipo y número de aberraciones observadas en cada animal;
- número total de aberraciones por lote;
- número de células con aberraciones por lote;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos, si se han realizado;
- datos de los controles negativos realizados en paralelo;
- datos anteriores sobre controles negativos, intervalos, medias y desviaciones estándar;
- datos de los controles positivos realizados en paralelo;
- variaciones de la ploidía, en su caso.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. En: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. y Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
2. Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. En: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt y J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
3. Evans, E.P., Breckon, G. y Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.
4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. y Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, En: D.J. Kirkland (ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
5. Yamamoto, K. y Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.
6. Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. y Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
7. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. y Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.
8. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. y Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays En: D.J. Kirkland (ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 24

ENSAYO DE LA MANCHA EN EL RATÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se trata de una prueba que se realiza *in vivo* en ratones, cuyos embriones en desarrollo se exponen a la sustancia estudiada. Las células efectoras de los embriones en desarrollo son los melanoblastos, y los genes efectores son los responsables de la pigmentación del pelo. Los embriones son heterocigotos para cierto número de estos genes. Una mutación en el alelo dominante de tal gen o su pérdida (a consecuencia de fenómenos genéticos diversos) en un melanoblasto provoca la expresión del fenotipo recesivo en sus células descendientes, con la aparición consiguiente de una mancha de otro color en el pelo del ratón resultante. Se cuenta el número de descendientes portadores de manchas (mutaciones), y se compara su frecuencia con la observada en la descendencia procedente del desarrollo de embriones tratados únicamente con el disolvente. La prueba de la mancha en el ratón descubre supuestas mutaciones somáticas en las células fetales.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Cuando sea posible, las sustancias se disuelven o suspenden en solución salina isotónica. Las que sean insolubles en agua se disolverán o suspenderán en vehículos apropiados. El vehículo utilizado no debe alterar la sustancia estudiada ni provocar efectos tóxicos. Deben emplearse preparaciones recientes de la sustancia objeto de estudio.

Animales de experimentación

Se aparean animales de la cepa T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, c^{ch}/c^{ch} ; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) con la cepa HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearlie/pe) o con la C57 BL (nonagouti, a/a). Pueden utilizarse otros cruces apropiados, como entre NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) y DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), siempre que produzcan descendencia nonagouti.

Número y sexo

Se tratan hembras grávidas suficientes para obtener un número de descendientes vivos apropiado para cada nivel posológico utilizado. El tamaño de la muestra dependerá del número de manchas observadas en los ratones tratados y de la importancia del número de datos de control. Sólo se considerará aceptable un resultado negativo si se han examinado al menos 300 descendientes de hembras tratadas con la dosis máxima.

Uso de controles negativos y positivos

Ha de disponerse de datos de control simultáneos procedentes de ratones tratados sólo con el vehículo (controles negativos). Pueden agruparse datos de control históricos obtenidos en el mismo laboratorio para mejorar la

sensibilidad de la prueba, siempre que tales datos sean homogéneos. Si la sustancia analizada no resulta ser mutágena, deberá disponerse de datos de control positivos obtenidos en fecha reciente en el mismo laboratorio con una sustancia de potencial mutágeno conocido en esta prueba.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal de las hembras grávidas. Cuando convenga, se recurrirá al tratamiento por inhalación u otras vías de administración.

Dosis

Se utilizan al menos dos niveles posológicos, incluido uno que origine signos de toxicidad o reduzca el tamaño de las camadas. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima practicable.

Procedimiento

Normalmente, se administra un tratamiento único los días 8, 9 ó 10 de la gestación, considerando como día 1 aquél en que se observe por primera vez el tapón vaginal. Estos días corresponden a 7,25, 8,25 y 9,25 días tras la concepción. Pueden efectuarse, pasados estos días, tratamientos sucesivos.

Análisis

Al cabo de tres o cuatro semanas del nacimiento, se asignan códigos a la descendencia y se comprueba si existen manchas. Se distinguen tres clases de manchas:

- a) las manchas blancas a menos de 5 mm de la línea mesoventral, que se suponen consecuencia de muerte celular (WMVS),
- b) las manchas amarillas, de tipo agouti, asociadas con los pezones, los órganos sexuales, la garganta, las regiones axilar e inguinal y la parte central de la frente, que se suponen debidas a falta de diferenciación (MDS), y
- c) las manchas pigmentadas y blancas repartidas al azar por el pelaje, que se creen resultado de mutaciones somáticas (RS).

Se cuentan las tres clases, pero sólo la última, la RS, tiene significación genética. Los problemas que plantea la diferenciación de las clases MDS y RS pueden solucionarse examinando muestras de pelo con el microscopio de fluorescencia.

Se observarán las anomalías morfológicas macroscópicas evidentes de la descendencia.

2. RESULTADOS

Los datos se presentarán en forma del número total de crías examinadas y del número de las que presenten una o varias manchas supuestamente debidas a mutación somática. Se compararán por métodos apropiados los datos de los animales tratados y los controles negativos. Asimismo, se ofrecerán los resultados considerando la camada como unidad.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- cepas utilizadas en el cruce
- número de hembras grávidas en los grupos experimental y de control
- tamaño medio de las camadas en los grupos experimentales y de control en el nacimiento y al destete
- dosis de la sustancia estudiada
- disolvente utilizado

- día de la gestación en que se administró el tratamiento
- vía de administración
- número total de descendientes examinados, y número con WMVS, MDS y RS en los grupos experimental y de control
- anomalías morfológicas macroscópicas
- relación dosis/respuesta de RS, si es posible
- evaluación estadística
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 25
TRANSLOCACIÓN HEREDITARIA EN EL RATÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La prueba de translocación hereditaria en el ratón descubre alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas en las células embrionarias de mamíferos, tal como se ponen de manifiesto en la descendencia de primera generación. Los tipos de alteraciones cromosómicas apreciados son translocaciones recíprocas y, si se incluye la descendencia femenina, pérdida del cromosoma X. Los portadores de translocaciones y las hembras XO muestran una fertilidad reducida que permite la selección de una descendencia F_1 para practicar un análisis citogenético. Una esterilidad total es consecuencia de tipos de translocación determinados (autosoma X y tipo c-t). Las translocaciones se observan citogenéticamente en las células meióticas en diacinesis-metafase I de los individuos machos, ya sean machos F_1 o hijos de hembras F_1 . Las hembras XO se identifican citogenéticamente por la presencia de sólo 39 cromosomas en las mitosis de la médula ósea.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Las sustancias objeto de estudio se disuelven en solución salina isotónica. Si son insolubles en agua, se disuelven o suspenden en vehículos apropiados. Se emplean soluciones recién preparadas de la sustancia estudiada. Si se utiliza un vehículo para facilitar la administración, no debe alterar el compuesto analizado ni provocar efectos tóxicos.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal, aunque pueden ser apropiadas otras vías.

Animales de experimentación

Para facilitar la reproducción y la verificación citológica, estos experimentos se realizan con ratones; no es preciso que sean de una cepa determinada. Sin embargo, el tamaño medio de una camada de la cepa empleada deberá ser superior a 8, y relativamente constante. Se utilizarán animales sanos y sexualmente maduros.

Número de animales

El número de animales necesario depende de la frecuencia de translocaciones espontáneas, así como del índice mínimo de inducción preciso para obtener un resultado positivo.

La prueba suele realizarse mediante análisis de la descendencia masculina F_1 . Al menos 500 descendientes machos F_1 se analizan por grupo de dosis. Si se incluye la descendencia femenina F_1 son necesarios 300 machos y 300 hembras.

Uso de controles negativos y positivos

Debe disponerse de datos sobre controles adecuados procedentes de pruebas realizadas simultáneamente y de controles históricos. Si existen resultados aceptables de controles positivos procedentes de experimentos efectuados en fecha reciente en el mismo laboratorio, pueden utilizarse en lugar de un control positivo simultáneo.

Dosis

Se prueba una dosis, por lo general la máxima asociada con la producción de efectos tóxicos mínimos pero que no altere el comportamiento reproductor ni la supervivencia. Para establecer una relación dosis/respuesta, son necesarias otras dos dosis. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima posible.

Procedimiento

Tratamiento y apareamiento

Existen dos programas de tratamiento. De ellos, el más utilizado es la administración única de la sustancia estudiada. La sustancia también puede administrarse los 7 días de la semana durante 35 días. El número de apareamientos tras el tratamiento dependerá del programa de administración, y garantizará la obtención de muestras de todos los estadios de las células embrionarias tratadas. Al final del período de apareamiento, se coloca a las hembras en jaulas individuales. Cuando dan a luz, se registra la fecha, el tamaño de la camada y el sexo de los descendientes. Se desteta a toda la descendencia masculina y se descarta toda la femenina, salvo si se incluyen en el experimento.

Búsqueda de los heterocigotos de translocación

Se utiliza uno de los dos métodos posibles:

- estudio de la fertilidad de la descendencia F_1 , y verificación posterior de posibles portadores de translocaciones por análisis citogenéticos;
- análisis citogenético de toda la progenie F_1 masculina sin selección previa mediante estudio de fertilidad.

a) Estudio de la fertilidad

Es posible determinar la fertilidad reducida de un individuo F_1 observando el tamaño de la camada, analizando el contenido uterino de su compañera femenina o por ambos medios. Es necesario fijar los criterios de determinación de la fertilidad normal y reducida de la cepa de ratón utilizada.

Observación del tamaño de la camada: Los machos F_1 sometidos a estudio se colocan en jaulas individuales con hembras procedentes del mismo experimento o de la colonia. Las jaulas se inspeccionan a diario a partir de los 18 días tras el apareamiento. Se registran, en el momento del nacimiento, el tamaño de la camada y el sexo de la descendencia F_2 , y se descartan luego las crías. Si se estudia la descendencia femenina F_1 , se conserva la descendencia F_2 procedente de camadas pequeñas para un análisis en mayor profundidad. Las hembras portadoras de una translocación se someten a verificación por análisis citogenético de una translocación en cualquiera de sus descendientes machos. Las hembras XO se identifican por la modificación de sexos en su descendencia, que pasa de 1:1 a 1:2 machos/hembras. En un método secuencial, los machos F_1 normales no se someten a nueva verificación si la primera camada F_2 alcanza o supera un valor normal predeterminado; de lo contrario, se observan una segunda y una tercera camadas F_2 .

Los animales F_1 que no puedan clasificarse como normales tras observación de hasta un máximo de tres camadas F_2 se someten a un nuevo control mediante análisis del contenido uterino de sus compañeras femeninas, o sufren directamente análisis citogenético.

Análisis del contenido uterino: La reducción del tamaño de las camadas en los portadores de translocaciones se debe a la muerte de embriones, por lo que un número alto de implantes muertos indica la presencia de una translocación en el animal sometido a la prueba. Cada macho F_1 estudiado se aparea con 2 ó 3 hembras. Se comprueba si existe concepción mediante el examen matinal diario para descubrir la presencia de tapones vaginales. Las hembras se sacrifican 14 ó 16 días después, y se registra el número de implantes vivos y muertos presentes en su útero.

b) Análisis citogenético

Se obtienen preparaciones de testículos por el método de secado con aire. Los portadores de translocaciones se identifican por la presencia de configuraciones multivalentes en diacinesis metafase I en los espermatoocitos primarios. La observación de al menos 2 células con una asociación multivalente constituye la prueba necesaria de que el animal estudiado es portador de una translocación.

Si no se ha realizado selección mediante análisis de la fecundidad, se practica estudio citogenético en todos los machos F_1 . Deben analizarse al microscopio un mínimo de 25 células en diacinesis/metafase I por macho. En los machos F_1 con testículos pequeños y que presenten una detención meiótica antes de la diacinesis, o en las hembras F_1 que se sospeche sean XO, es necesario el examen de las metafases mitóticas en los espermatogonios o en la médula ósea. La presencia de un cromosoma desusadamente largo o corto en 10 células, demuestra la existencia de una translocación especial que origina la esterilidad del macho (tipo c-t). Algunas translocaciones X autosomas que provocan la esterilidad del macho sólo pueden identificarse mediante un análisis de las bandas de cromosomas mitóticos. La presencia de 39 cromosomas en la totalidad de 10 mitosis es demostrativa de un estado XO en una hembra.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

Se registran, en el nacimiento y el destete para cada período de apareamiento, el tamaño medio de las camadas y la relación entre sexos.

En lo que respecta a la evaluación de la fertilidad de los animales F_1 , se expondrán el tamaño medio de las camadas procedentes de todos los apareamientos normales, así como el tamaño de cada una de las surgidas de animales F_1 portadores de translocación. En cuanto al análisis del contenido uterino, se harán constar el número medio de implantes vivos y muertos producto de apareamientos normales, y el de implantes vivos y muertos de cada apareamiento de portadores de translocación.

Respecto al análisis citogenético de la diacinesis-metafase I, se enumerarán el número de tipos diferentes de configuraciones multivalentes y el número total de células en cada portador de translocación.

Se comunicarán el número total de apareamientos y la duración del período de apareamiento de los individuos estériles F_1 . Se facilitarán asimismo el peso de los testículos y detalles del análisis citogenético.

Para hembras XO, se dan resultados del tamaño medio de la camada, de la razón de sexos de la progenie F_2 y del análisis citogenético.

Cuando se preseleccionan, por pruebas de fertilidad, posibles F_1 portadores de translocación, las tablas deben incluir información relativa a cuántos de éstos eran heterocigotos de translocación confirmados.

Se dan también datos de los experimentos de control negativo y control positivo.

3. INFORME

3.1. Datos de la prueba

El informe incluirá los datos siguientes:

- cepa de ratones, edad de los animales, pesos de los animales tratados
- número de animales reproductores de cada sexo en los grupos experimentales y de control
- condiciones de la prueba, descripción detallada del tratamiento, niveles de las dosis, disolventes, frecuencia de apareamientos
- número y sexo de los descendientes por cada hembra, número y sexo de los descendientes criados para análisis de translocación
- tiempos y criterios de análisis de translocación
- número y descripción detallada de los portadores de translocación, incluyendo datos de reproducción y de contenido uterino, cuando proceda
- procedimientos citogenéticos y detalles del análisis microscópico, preferiblemente con fotografías
- evaluación estadística
- discusión de resultados
- interpretación de resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.26. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA

TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN ROEDORES

1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad oral subcrónica reproduce las directrices del documento OCDE TG 408 (1998).

1.1 INTRODUCCIÓN

Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral subcrónica por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda o por administración continuada durante 28 días hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El estudio de 90 días aporta información sobre los peligros que puede presentar para la salud una exposición continuada durante un período prolongado, que abarque la maduración posterior al destete y el crecimiento hasta la edad adulta. La información obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar las dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana.

El presente método hace especial hincapié en los parámetros neurológicos y proporciona una indicación de los efectos sobre el sistema inmunitario y la reproducción. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método sirve para detectar sustancias químicas que pueden tener efectos tóxicos sobre el sistema nervioso, inmunitario o los órganos reproductores, lo cual puede justificar la realización de estudios más exhaustivos.

Véase también la introducción general de la Parte B.

1.2 DEFINICIONES

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (p. ej., mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

Posología: término general, que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

NOAEL: sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra diariamente la sustancia de ensayo por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante 90 días. A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo, así como a los que sobrevivan al final del mismo.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Preparación de los animales

Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Éstos se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto.

1.4.2 **Preparación de las dosis**

La sustancia de ensayo se administra por sonda o con el alimento o el agua de bebida. El método de administración oral depende del objetivo del estudio y de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicológicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en las condiciones de administración.

1.4.3 **Condiciones del ensayo**

1.4.3.1 *Animales de experimentación*

La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio habitual. Las hembras han de ser nulíparas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras de destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad. Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales empleados ha de ser mínima y no superar el $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo. Cuando el ensayo se realice como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios animales de la misma cepa y procedencia.

1.4.3.2 *Número y sexo*

Deben utilizarse por lo menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) para cada dosis. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio. Sobre la base de los conocimientos previos relativos a la sustancia química u otra sustancia muy próxima, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) en el control y con la dosis más elevada para observar la reversibilidad o persistencia de efectos tóxicos una vez finalizado el tratamiento. La duración del período de observación posterior al tratamiento ha de establecerse adecuadamente en función de los efectos observados.

1.4.3.3 *Posología*

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el apartado 1.4.3.4). Para establecer las dosis pueden emplearse los resultados de los estudios de administración continuada o de determinación de dosis y debe tomarse en consideración toda la información toxicológica y toxicocinética disponible sobre la sustancia de ensayo o productos afines. A menos que las características fisicoquímicas o los efectos biológicos de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis. La dosis mínima será la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 6-10) entre dosis.

El lote de control no recibe la sustancia de ensayo, pero sí recibe el vehículo en caso de que éste se utilice para la sustancia. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se emplea un vehículo, el lote de control ha de recibir el mayor volumen utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para saber si la disminución se debe a las características organolépticas o a alteraciones toxicológicas del modelo de ensayo.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo, efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales.

1.4.3.4 *Ensayo límite*

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario

realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 Administración de las dosis

Las dosis de ensayo se administran diariamente a los animales durante 90 días. Cualquier otra posología, por ejemplo, de cinco días por semana, debe justificarse. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal y no debe superar 1 ml/100g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100g de peso corporal. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de 90 días como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, debe emplearse la misma dieta en ambos.

1.5.2 Observaciones

El período de observación debe durar al menos 90 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite para las observaciones de seguimiento durante un período adecuado y sin tratamiento, a fin de detectar la persistencia o la desaparición de los efectos tóxicos.

Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales. Se examinan todos los animales al menos dos veces al día, por lo general a primera y a última hora, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

Todos los animales deben someterse al menos a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para poder realizar comparaciones en un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, preferiblemente en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.)(1).

Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, a ser posible de todos los animales, pero al menos en el lote con la dosis más alta y en el lote de control. Si se observan cambios oculares en esos animales, deben examinarse todos los demás.

Hacia el final del período de exposición, pero en ningún caso antes de la undécima semana, debe evaluarse la reactividad sensorial frente a estímulos de distintos tipos (1) (por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos) (2)(3)(4), la fuerza de prensión (5) y la actividad motriz (6). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

Las observaciones funcionales hacia el final del estudio pueden omitirse si se dispone de datos sobre dichas observaciones realizadas en otros estudios y las observaciones clínicas diarias no ponen de manifiesto alteraciones funcionales.

De forma excepcional, también pueden omitirse las observaciones funcionales en los lotes que muestren signos de toxicidad de otro tipo tales que interfieran significativamente con los resultados de las pruebas funcionales.

1.5.2.1 *Peso corporal y consumo de alimentos y agua*

Al menos una vez por semana deben pesarse todos los animales, medirse el consumo de alimentos y, si la sustancia de ensayo se administra con el agua de bebida, también el consumo de agua. Éste último puede vigilarse, asimismo, en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra con los alimentos o mediante sonda y la ingestión de agua pueda verse alterada.

1.5.2.2 *Hematología y bioquímica clínica*

Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado y conservarse, si procede, en condiciones adecuadas. Al final del período de ensayo, las muestras se toman justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio.

Deben practicarse los siguientes exámenes hematológicos al final del período de ensayo y con las muestras tomadas a lo largo del mismo: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación sanguínea.

Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos, y especialmente en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes de su sacrificio o como parte del método de sacrificio (aparte de los moribundos o sacrificados a lo largo del ensayo). Al igual que los exámenes hematológicos, los análisis de bioquímica clínica pueden realizarse en muestras tomadas en el transcurso del ensayo. Se recomienda que los animales estén en ayunas desde el día anterior a la toma de muestras⁽¹⁾. Los parámetros medidos en el plasma y el suero deben incluir las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, nitrógeno residual en sangre, creatinina, proteínas totales y albúmina, y al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa o sorbitol deshidrogenasa). La determinación de otras enzimas (de origen hepático o no) y de ácidos biliares puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.

Pueden realizarse, con carácter facultativo, las siguientes determinaciones en la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas.

Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores séricos de lesiones tisulares generales. Otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo pueden afectar a las funciones metabólicas correspondientes incluyen la concentración de calcio, fósforo, triglicéridos en ayunas, hormonas específicas, metahemoglobina y colinesterasa. Debe valorarse la necesidad de hacer éstos análisis con las sustancias de determinadas clases o bien según cada caso.

Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de las especies y los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

Si los datos disponibles sobre antecedentes no son adecuados, debe plantearse la determinación de variables hematológicas y bioquímicas clínicas antes de iniciar la administración de la sustancia; por lo general, se desaconseja obtener dichos datos antes del tratamiento (7).

1.5.2.3 *Autopsia macroscópica*

Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimos, útero, ovarios, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

(1) El ayuno desde la víspera es preferible para ciertas medidas en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, no obstante, el ayuno desde la víspera puede interferir con el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra en los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Si se opta por el ayuno desde la víspera, las determinaciones de bioquímica clínica deben realizarse después de las observaciones funcionales del estudio.

Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse: todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal (cervical, torácica media y lumbar), hipófisis, tiroides, paratiroides, timo, esófago, glándulas salivares, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, páncreas, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, tráquea y pulmones (conservados mediante inflado con fijador, seguido de inmersión), aorta, gónadas, útero, órganos sexuales secundarios, glándula mamaria de las hembras, próstata, vejiga urinaria, vesícula biliar (ratón), ganglios linfáticos (preferiblemente un ganglio relacionado con la vía de administración y otro distante de la misma para tener en cuenta los efectos sistémicos), nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, una sección de la médula ósea (y/o médula ósea aspirada y recién montada), piel y ojos (si se han observado cambios durante los exámenes oftalmológicos). Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. También deben conservarse todos los posibles órganos diana, según las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo.

1.5.2.4 *Examen histopatológico*

Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, estos exámenes se ampliarán a animales de todos los demás lotes tratados.

Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1 **RESULTADOS**

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.

Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio.

2.2 **INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1 **Sustancia de ensayo:**

- naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas;
- identificación química;
- vehículo (si procede): justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

2.2.2 **Especie sometida a ensayo:**

- especie y cepa empleada;
- número, edad y sexo de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;
- peso de cada animal al inicio del ensayo.

2.2.3 **Condiciones de ensayo:**

- justificación de la elección de las dosis;
- datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado;
- datos de la administración de la sustancia de ensayo;
- dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso;
- datos de la calidad de los alimentos y el agua.

2.2.4 **Resultados:**

- peso corporal y cambios en el mismo;
- consumo de alimentos y de agua, en su caso;
- datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad;
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no);
- resultados del examen oftalmológico;
- evaluación de la actividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz (si procede);
- pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia;
- pruebas de bioquímica clínica con los correspondientes valores de referencia;
- peso corporal y peso de los órganos en el momento del sacrificio, y relación peso órgano/peso corporal;
- hallazgos de la autopsia;
- descripción pormenorizada de todas las observaciones histopatológicas;
- datos sobre la absorción, si los hay;
- tratamiento estadístico de los resultados, si procede;

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

3. **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, **40**, 999-1003.
- (3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, **9**, 691-704.
- (4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 267-283.
- (5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, **1**, 233-236.
- (6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, **13**, 599-609.

- (7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, 198-201.

B.27. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA

TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN NO ROEDORES

1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad oral subcrónica reproduce las directrices del documento OCDE TG 409 (1998).

1.1 INTRODUCCIÓN

Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral subcrónica por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda o por administración continuada durante 28 días hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El estudio de 90 días aporta información sobre los peligros que puede presentar para la salud una exposición continuada durante un período de crecimiento rápido hasta el principio de la edad adulta. La información obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar las dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana.

El presente ensayo pone de manifiesto los efectos adversos en animales no roedores de la exposición a sustancias químicas y está indicado sólo en los casos siguientes:

- cuando los efectos observados en otros estudios indiquen la necesidad de aclarar y precisar algunos aspectos en una especie no roedora, o
- cuando los estudios toxicocinéticos indiquen que los animales de experimentación idóneos han de pertenecer a una especie determinada no roedora, o
- cuando haya otros motivos concretos para emplear una especie no roedora.

Véase también la introducción general de la Parte B.

1.2 DEFINICIONES

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (p. ej., mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

Posología: término general, que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

NOAEL: sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra diariamente la sustancia de ensayo por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante 90 días. A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo, así como a los que sobrevivan al final del mismo.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Selección de la especie animal

Suele emplearse el perro, preferiblemente de una raza definida. Con frecuencia se utiliza el sabueso. También pueden emplearse otras especies como el cerdo o el cerdo enano. No se recomiendan los primates; su uso ha de justificarse. Deben emplearse animales jóvenes y sanos y, en el caso del perro, la administración de sustancia de ensayo debe comenzar preferiblemente a la edad de 4-6 meses, pero nunca después de los 9 meses. Si el ensayo se realiza como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios animales de la misma especie y raza.

1.4.2 Preparación de los animales

Deben emplearse animales jóvenes y sanos, que se hayan mantenido en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. La duración de la aclimatación dependerá de la especie de ensayo seleccionada y de su procedencia: se recomienda un mínimo de 5 días para los perros y los cerdos criados con ese propósito en un animalario del laboratorio, y de dos semanas si proceden de una fuente exterior. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Éstos se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto.

1.4.3 Preparación de las dosis

La sustancia de ensayo se administra con el alimento o el agua de bebida, por sonda o en cápsulas. El método de administración oral depende del objetivo del estudio y de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicológicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en las condiciones de administración.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 Número y sexo de los animales

Deben utilizarse por lo menos 8 animales (4 hembras y 4 machos) para cada dosis. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio. El número de animales vivos al término del estudio debe permitir una evaluación significativa de los efectos tóxicos. Sobre la base de los conocimientos previos relativos a la sustancia química u otra sustancia muy próxima, puede tratarse un lote satélite de 8 animales (4 de cada sexo) en el control y con la dosis más elevada para observar la reversibilidad o persistencia de efectos tóxicos una vez finalizado el tratamiento. La duración del período de observación posterior al tratamiento ha de establecerse adecuadamente en función de los efectos observados.

1.5.2 **Posología**

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el apartado 1.5.3). Para establecer las dosis pueden emplearse los resultados de los estudios de administración continuada o de determinación de dosis y debe tomarse en consideración toda la información toxicológica y toxicocinética disponible sobre la sustancia de ensayo o productos afines. A menos que las características fisicoquímicas o los efectos biológicos de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis. La dosis mínima será la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 6-10) entre dosis.

El lote de control no recibe la sustancia de ensayo, pero sí recibe el vehículo en caso de que éste se utilice para la sustancia. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se emplea un vehículo, el lote de control ha de recibir el mayor volumen utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para saber si la disminución se debe a las características organolépticas o a alteraciones toxicológicas del modelo de ensayo.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo, efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales.

1.5.3 **Ensayo límite**

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5.4 **Administración de las dosis**

Las dosis de ensayo se administran diariamente a los animales durante 90 días. Cualquier otra posología, por ejemplo, de cinco días por semana, debe justificarse. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. Por lo general, el volumen ha de ser el mínimo posible. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda o en cápsulas, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de 90 días como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, debe emplearse la misma dieta en ambos.

1.5.5 **Observaciones**

El período de observación debe durar al menos 90 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite para las observaciones de seguimiento durante un período adecuado y sin tratamiento, a fin de detectar la persistencia o la desaparición de los efectos tóxicos.

Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales. Se examinan todos los animales al menos dos veces al día, por lo general a primera y a última hora, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

Todos los animales deben someterse al menos a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para poder realizar comparaciones en un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse, si es posible, fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y preferiblemente siempre a la misma hora. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos de toxicidad han de anotarse cuidadosamente, así como el momento de aparición, la gravedad y la duración. Las observaciones deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos.

Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, a ser posible de todos los animales, pero al menos en el lote con la dosis más alta y en el lote de control. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás.

1.5.5.1 *Peso corporal y consumo de alimentos y agua*

Al menos una vez por semana deben pesarse todos los animales, medirse el consumo de alimentos y, si la sustancia de ensayo se administra con el agua de bebida, también el consumo de agua. Éste último puede vigilarse, asimismo, en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra con los alimentos o mediante sonda y la ingestión de agua pueda verse alterada.

1.5.5.2 *Hematología y bioquímica clínica*

Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado y conservarse, si procede, en condiciones adecuadas. Al final del período de ensayo, las muestras se toman justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio.

Al principio del ensayo y, a continuación, bien una vez al mes bien a la mitad del período de ensayo, así como al término del mismo, debe practicarse un examen hematológico que incluya hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida de la capacidad de coagulación como el tiempo de coagulación, de protrombina o de tromboplastina.

Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos, y especialmente en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales al principio del ensayo y, a continuación, bien una vez al mes bien a la mitad del período de ensayo, así como al término del mismo. Debe estudiarse el equilibrio electrolítico, el metabolismo glucídico y las funciones hepática y renal. La elección de determinados análisis dependerá de las observaciones sobre el modo de actuación de la sustancia de ensayo. Los animales deben estar en ayunas antes de las tomas de sangre, durante un período adecuado según la especie. Se propone determinar el calcio, fósforo, cloro, sodio, potasio, glucosa en ayunas, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, ornitina descarboxilasa, gamma-glutamyl transpeptidasa, nitrógeno residual, albúmina, creatinina en sangre, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Deben practicarse análisis de orina, como mínimo, al inicio, a la mitad y al final del ensayo, utilizando la recogida programada, con el fin de estudiar los parámetros siguientes: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.

Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores de lesiones tisulares generales. Para realizar una evaluación toxicológica adecuada pueden ser necesarias otras determinaciones como el análisis de los lípidos, hormonas, equilibrio ácido-básico, metahemoglobina e inhibición de la colinesterasa. Si es preciso, pueden realizarse análisis de bioquímica clínica adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados. Debe valorarse la necesidad de hacer éstos análisis con las sustancias de determinadas clases o bien según cada caso.

Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de las especies y los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

1.5.5.3 *Autopsia macroscópica*

Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado y la vesícula biliar, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimos, ovarios, útero, glándulas tiroideas y paratiroides, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse: todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal (cervical, torácica media y lumbar), hipófisis, ojos, tiroides, paratiroides, timo, esófago, glándulas salivares, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, vesícula biliar, páncreas, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, tráquea y pulmones, aorta, gónadas, útero, órganos sexuales secundarios, glándula mamaria de las hembras, próstata, vejiga urinaria, ganglios linfáticos (preferiblemente un ganglio relacionado con la vía de administración y otro distante de la misma para tener en cuenta los efectos sistémicos), nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, una sección de la médula ósea (y/o médula ósea aspirada y recién montada) y piel. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. También deben conservarse todos los posibles órganos diana, según las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo.

1.5.5.4 *Examen histopatológico*

Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados, al menos, de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, este examen se ampliará a animales de todos los demás lotes tratados.

Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1 RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.

Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio.

2.2 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1 **Sustancia de ensayo:**

- naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas;
- identificación química;
- vehículo (si procede): justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

2.2.2 **Especie sometida a ensayo:**

- especie y cepa empleada;
- número, edad y sexo de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;
- peso de cada animal al inicio del ensayo.

2.2.3 **Condiciones de ensayo:**

- justificación de la elección de las dosis;
- datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado;
- datos de la administración de la sustancia de ensayo;
- dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso;
- datos de la calidad de los alimentos y el agua.

2.2.4

Resultados:

- peso corporal y cambios en el mismo;
- consumo de alimentos y de agua, en su caso;
- datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad;
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no);
- examen oftalmológico;
- pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia;
- pruebas de bioquímica clínica con los correspondientes valores de referencia;
- peso corporal y peso de los órganos en el momento del sacrificio, y relación peso órgano/peso corporal;
- hallazgos de la autopsia;
- descripción pormenorizada de todas las observaciones histopatológicas;
- datos sobre la absorción, si los hay;
- tratamiento estadístico de los resultados, si procede;

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

B. 28

TOXICIDAD DÉRMICA SUBCRÓNICA

ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se aplican a diario dosis crecientes de la sustancia estudiada en la piel de animales de experimentación integrados en varios grupos, a razón de una dosis por grupo durante un período de 90 días. Durante el período de aplicación se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren durante la prueba se someten a autopsia, que se practica también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Antes de proceder a la aplicación, se elimina el pelo de la región dorsal del tronco de los animales. Puede emplearse afeitado, pero deberá practicarse aproximadamente 24 horas antes de la prueba. Suelen ser necesarios cortes o afeitados reiterados del pelo, más o menos a intervalos semanales. Al practicarlos, hay que cuidar de no lesionar la piel. Deberá dejarse despejada, para la aplicación de la sustancia en estudio, una superficie no inferior al 10 % de la corporal. Para decidir la zona que debe despejarse y las dimensiones de la superficie a tratar, se tendrá en cuenta el peso del animal. Cuando se prueben sólidos, que pueden pulverizarse si se considera oportuno, se humedecerá lo suficiente la sustancia estudiada con agua o, en caso necesario, un vehículo apropiado para garantizar un buen contacto con la piel. Las sustancias líquidas se emplean por lo general sin diluir. Se practican aplicaciones diarias 5 ó 7 días a la semana.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Pueden emplearse ratas, conejos o cobayas adultos. Es posible emplear otras especies, pero su uso exigiría justificación. Al principio de la prueba, los pesos no diferirán en un porcentaje superior al ± 20 % del peso medio.

Cuando se realice una prueba dérmica subcrónica como preliminar a una de índole crónica, se utilizará en ambas la misma especie y cepa.

Número y sexo

Se utilizarán al menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) con piel sana para cada dosis. Las hembras serán nulíparas y no estarán preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además, puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (10 de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días para observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Dosis

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos y un control, o un control para el vehículo si se emplea éste. El período de exposición no será inferior a 6 horas diarias. La aplicación de la sustancia de prueba debe hacerse a las mismas horas todos los días, y la cantidad del producto se ajustará a intervalos (semanales o quincenales) de forma que se mantenga una dosis constante en relación con el peso del animal. Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo de control deben recibir un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. Cuando se utilice un vehículo para facilitar la administración, el grupo de control lo recibirá de igual modo que los grupos tratados, y en cantidad igual a la administrada al grupo con dosis más alta. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. La dosis más baja no debe originar signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a ese valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados. En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Si la aplicación de la sustancia probada provoca una irritación cutánea grave, se reducirán las concentraciones, lo que quizá origine una reducción, o la ausencia, de otros efectos tóxicos con la dosis alta. Si la piel ha sufrido lesiones importantes, quizá sea necesario dar por concluido el estudio y emprender uno nuevo a concentraciones menores.

Prueba de límite

Si una experiencia previa realizada con una dosis de 1 000 mg/kg, o superior, en función de la posibilidad de exposición humana (siempre que ésta se conozca) no ha provocado efecto tóxico alguno, cabe considerar inútil la continuación de la experiencia.

Período de observación

Es preciso observar a diario a los animales de experimentación en busca de signos de toxicidad. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

Los animales se alojarán en jaulas individuales. El régimen ideal comprende la administración, a los animales, de la sustancia ensayada los 7 días de la semana durante un período de 90 días.

Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben observarse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia. El período de exposición diario será de 6 horas.

La sustancia estudiada se aplicará uniformemente sobre una zona que corresponda aproximadamente al 10 % de la superficie corporal total. En caso de sustancias muy tóxicas, la zona tratada puede ser inferior, pero se cubrirá con una capa lo más uniforme y delgada posible.

Durante la exposición, la sustancia estudiada se mantiene en contacto con la piel con ayuda de un apósito de gasa poroso y esparadrapo no irritante. Además, la zona tratada se cubrirá de forma que se mantengan colocados el apósito y la sustancia y se impida a los animales la ingestión de ésta. Cabe utilizar dispositivos de sujeción para evitar la ingestión de la sustancia objeto de estudio, pero no se recomienda la inmovilización completa.

Al final del período de exposición, se eliminará la sustancia restante, siempre que sea posible, por medio de agua o algún otro método apropiado de limpieza de la piel.

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Entre las observaciones que deben practicarse sobre los animales enjaulados destacan las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento y el peso de los animales. Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los supervivientes de los grupos de tratamiento no satélites. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

- a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.

- b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento y fórmula leucocitarios, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.
- c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepáticas y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y gluamicooxaloacética ⁽²⁾ séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.
- d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pasarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado para un posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido tímico, (tráquea), pulmones, corazón, aorta, (glándulas salivales), hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, órganos genitales accesorios, vesícula biliar (si existe), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, ileon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo, (glándula mamaria femenina), (músculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), (esternón con médula ósea), (fémur, incluida superficie articular), (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar) y (glándulas lagrimales exorbitarias). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

- a) Se someterán a un examen histopatológico completo la piel normal y la tratada, y los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y los de dosis máxima.
- b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.
- c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.
- d) Si se utilizan ratas, se someterán los pulmones de los animales integrantes de los grupos con dosis mínimas e intermedias a examen histopatológico en busca de signos de infección, ya que esta medida permite una evaluación cómoda del estado de salud de los animales. Es posible que en los animales de estos grupos no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.
- e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.
⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

3. **INFORME**

3.1. **Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba
- dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis
- dosis carente de efectos, si es posible
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- hallazgos oftalmológicos
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 29
TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR INHALACIÓN

ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se expone a diario, durante un período de tiempo determinado, a varios grupos de animales de experimentación, a concentraciones diferentes de la sustancia objeto de estudio, una concentración por grupo, durante un plazo de 90 días. En los casos en que se emplea un vehículo como ayuda para lograr una concentración apropiada de la sustancia ensayada en la atmósfera, se utilizará un grupo de control del vehículo. Durante el período de administración, se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueran durante la prueba se someterán a autopsia, que se practicará también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. En caso necesario, se añadirá a la sustancia estudiada un vehículo adecuado que ayude a lograr una concentración apropiada de la sustancia en la atmósfera. Si se utilizaran un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, deberán saberse exentos de efectos tóxicos. Si se juzga oportuno, pueden emplearse datos publicados.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Salvo indicación en contrario, la especie preferible es la rata. Se utilizarán animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual. Al principio del estudio, los pesos no diferirán en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio apropiado. Cuando se realice un estudio de inhalación subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos la misma especie y cepa.

Número y sexo

Se utilizarán al menos 20 animales (diez hembras y diez machos) para cada concentración de exposición. Las hembras serán nulíparas y no estarán preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (diez de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días para observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Concentración de exposición

Son necesarias al menos tres concentraciones, y un control o control del vehículo (correspondiente a la concentración del vehículo en el nivel de exposición máximo). Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo de control recibirán un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a este valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados. En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Período de exposición

La exposición diaria será de 6 horas tras la obtención de las concentraciones en la cámara de exposición. Cabe utilizar otros períodos para satisfacer necesidades especiales.

Equipo

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Cuando se utilice una cámara, deberá ser de características tales que permita un hacinamiento mínimo de los animales y su exposición óptima a la sustancia objeto de ensayo. Como norma general para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada. También cabe recurrir a sistemas con exposición oronasal, de la cabeza sola o de todo el cuerpo en cámara individual; los dos primeros reducen la penetración por otras vías.

Período de observación

Es preciso observar a diario a los animales de experimentación en busca de signos de toxicidad. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

Se expone a los animales diariamente a la sustancia estudiada, a razón de 5 ó 7 días a la semana, durante un período de 90 días. Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben mantenerse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia. La temperatura a la que se efectúa la prueba debe mantenerse, con variaciones de $\pm 3^\circ$ en 22° C. La humedad relativa ideal sería la comprendida entre el 30 y el 70 %, pero en determinados casos (p. ej., pruebas con aerosoles) quizá no sea factible. Durante la exposición, se suprimirán el alimento y la bebida.

Se utilizará un sistema de inhalación dinámico que disponga de un sistema apropiado de control analítico de la concentración. Se recomienda practicar un primer ensayo para determinar las concentraciones de exposición adecuadas. Se ajustará el flujo de aire de forma que se garanticen unas condiciones de exposición homogéneas en toda la cámara. El sistema permitirá obtener condiciones de exposición estables con la mayor rapidez posible.

Se determinarán o controlarán:

- a) El flujo de aire (continuamente).
- b) La concentración real de la sustancia estudiada, medida en la zona de respiración. Durante el período de exposición diaria, la concentración no diferirá en más del ± 15 % del valor medio. No obstante, cuando se trate de polvos y aerosoles, quizá no sea posible esta precisión, y podrá aceptarse una desviación mayor. Se mantendrán durante la totalidad del estudio lo más constante posible las concentraciones diarias. Al ajustar el sistema generador, se practicará un análisis granulométrico de las partículas, para determinar la estabilidad de las concentraciones de aerosol. Durante la exposición, se practicarán con la frecuencia necesaria análisis para determinar la estabilidad de la distribución granulométrica.
- c) Temperatura y humedad.
- d) Durante la exposición y después de ella, se practican y registran sistemáticamente observaciones; se llevarán fichas individuales de cada animal. Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Entre las observaciones deben figurar las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos, las membranas mucosas, los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Se determinarán cada semana el consumo de alimento y el peso de los animales. Es necesaria una observación periódica de los animales para

evitar la pérdida de alguno de ellos por causas como canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los animales supervivientes. Los animales moribundos deben retirarse y someterse a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

- a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.
- b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento y fórmula leucocitarios, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.
- c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepática y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutámico-pirúvica ⁽¹⁾ y glutámico-oxaloacética ⁽²⁾ séricas, ornitindecarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.
- d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado para un posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, los pulmones — que se extirparán intactos, se pesarán y se tratarán con un fijador adecuado para garantizar el mantenimiento de su estructura (se considera método eficaz la perfusión con el fijador) —, los tejidos nasofaríngeos, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, pulmones, corazón, aorta, glándulas salivales, hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, (órganos genitales accesorios), (piel), vesícula biliar (si existe), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, ileon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo (glándula mamaria femenina), (músculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), esternón con médula ósea, (fémur, incluida superficie articular), y (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

- a) Se someterán a un examen histopatológico completo el aparato respiratorio y otros órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y con la dosis máxima.
- b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.
- c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.
- d) Se someterán también a examen histopatológico los pulmones de los animales pertenecientes a los grupos con dosis baja e intermedia, por constituir un medio conveniente de valoración del estado de salud de los animales. Es posible que en los animales de estos grupos no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.
- e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. **Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba:
 - Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.
 - Datos de exposición: Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:
 - a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación
 - b) temperatura y humedad del aire
 - c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)
 - d) naturaleza del vehículo, si se emplea
 - e) concentraciones reales en la zona de respiración
 - f) dimensiones medias de las partículas (si procede)
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la concentración
- dosis carente de efectos, si es posible
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- hallazgos oftalmológicos
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 30

ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia objeto de estudio se administra normalmente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (de roedores o no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos, de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 40 animales (20 hembras y 20 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nulíparas y no grávidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

En no roedores, puede aceptarse un número menor de animales, aunque no inferior a cuatro por sexo y grupo.

Dosis y frecuencia de exposición

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos definidos de toxicidad sin causar una mortalidad excesiva. La dosis más baja no debe provocar indicio alguno de toxicidad.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Normalmente, la exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgente de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará también un grupo de control negativo concurrente. Este grupo de control negativo se tratará de igual manera que los grupos de prueba, salvo en que los animales no se expondrán a la sustancia estudiada ni a ningún vehículo.

Vía de administración

Las dos vías de administración principales son la oral y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

El uso de la vía dérmica plantea problemas prácticos considerables. Normalmente, es posible deducir la toxicidad crónica general debida a la absorción percutánea de los resultados de la prueba hecha por vía oral y de la cantidad de sustancia absorbida por vía percutánea en pruebas de toxicidad percutánea previas.

Estudios orales:

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, y si la ingestión es una vía posible de exposición humana, se preferirá la vía oral de administración, salvo si existen contraindicaciones. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas. Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis a la semana es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el periodo exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios de inhalación:

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales 5 días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los 7 días de la semana (exposición permanente) con una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de la sustancia objeto de estudio. Una diferencia importante entre la exposición intermitente y la permanente es que con la primera existe un período de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un período de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de control, más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de, al menos, 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

- (i) Flujo del aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.
- (ii) Concentración: durante el período diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del $\pm 15\%$ del valor medio.
- (iii) Temperatura y humedad: en roedores, la temperatura se mantendrá a $22^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$, y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70 %, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.
- (iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de éste no sea respirable.

Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad, cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

La duración del período de administración será de, al menos, doce meses.

Procedimiento

Observaciones

Se realizará, al menos una vez al día, una exploración clínica detenida. Se practicarán diariamente observaciones complementarias, y se adoptarán medidas apropiadas para reducir al mínimo las pérdidas de animales del estudio, en forma, por ejemplo, de autopsia o refrigeración de los animales encontrados muertos, y de aislamiento o sacrificio de los débiles o moribundos. Son necesarias observaciones detenidas para apreciar el comienzo y la evolución de efectos tóxicos, así como para reducir las pérdidas de animales por enfermedad, autólisis o canibalismo.

Se anotarán para todos los animales los signos clínicos, incluidas tanto las alteraciones neurológicas y oculares como la mortalidad. Se registrarán el momento de comienzo y la evolución de los procesos tóxicos, incluidos los presuntos tumores.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del período de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad. Se determinará la ingestión de alimento cada semana durante las 13 primeras del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo que el estado de salud o las modificaciones del peso aconsejen otra actitud.

Examen hematológico

Se realizará un examen hematológico (p. ej., contenido de hemoglobina, hematocrito, recuentos de hematies y leucocitos, plaquetas u otras medidas de la capacidad de coagulación) a los tres y a los seis meses, y después con intervalos aproximados de seis y, al final, sobre muestras de sangre recogidas de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos. A ser posible, las muestras procederán de las mismas ratas en cada intervalo. Además, a los no roedores se les extraerá una muestra antes de la prueba.

Si las observaciones clínicas indican un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se practicará un recuento con fórmula leucocitaria de los animales afectados.

Se averiguará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales del grupo con dosis máxima y de los controles. Sólo se determinará en los grupos con dosis menores si se aprecia una discrepancia importante entre el grupo con dosis máxima y los controles, o si lo aconsejan los hallazgos patológicos.

Análisis de orina

Se recogerán para su análisis muestras de orina de todos los animales no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas que sirvan para el examen hematológico y respetando intervalos idénticos. Se realizarán las determinaciones siguientes en animales individuales, o en una muestra acumulada/sexo/grupo en el caso de los roedores:

- aspecto: volumen y densidad en cada animal

- proteínas, glucosa, cetonas, sangre oculta (semicuantitativamente)
- microscopía del sedimento (semicuantitativamente).

Química clínica

Con intervalos aproximados de 6 meses y a la conclusión, se extraen muestras de sangre para determinaciones de química clínica de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas en cada intervalo. Además, se recogerá en todos los no roedores una muestra previa a la prueba. Se prepara plasma a partir de estas muestras, y se realizan las determinaciones siguientes:

- concentración de proteínas totales
- concentración de albúmina
- pruebas de función hepática (como actividad de fosfatasa alcalina, transaminasa glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y transaminasa glutamicoxaloacética ⁽²⁾, gammaglutamiltranspeptidasa, ornitindescarboxilasa
- metabolismo de carbohidratos, como glucemia en ayunas
- pruebas de función renal, como nitrógeno ureico en sangre.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Antes del sacrificio, se recogerán de todos los animales muestras de sangre para la realización de recuentos sanguíneos con fórmula leucocitaria. Se conservarán todas las lesiones macroscópicas visibles, así como los tumores o lesiones que se sospeche son tumores. Se intentarán relacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

Se conservarán para examen histopatológico todos los órganos y tejidos, habitualmente los siguientes: cerebro ⁽³⁾ (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, (incluidas paratiroides), timo, pulmones (incluida tráquea), corazón, aorta, glándulas salivales, hígado ⁽²⁾, bazo, riñones ⁽³⁾, suprarrenales ⁽³⁾, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, útero, vejiga urinaria, ganglios linfáticos, páncreas, gónadas ⁽³⁾, órganos genitales accesorios, glándula mamaria femenina, piel, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea y fémur (incluida articulación) y ojos. El inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el medio óptimo de conservación de estos tejidos; por otro lado, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se examinará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Si se realizan otros exámenes clínicos, la información con ellos obtenida deberá estar disponible antes del examen microscópico, ya que puede suponer una orientación importante para el anatomopatólogo.

Examen histopatológico

Se examinarán al microscopio todas las alteraciones visibles, y en particular los tumores y demás lesiones aparecidas en cualquier órgano. Se recomiendan además los procedimientos siguientes:

- a) Examen microscópico de todos los órganos y tejidos conservados, con descripción completa de todas las lesiones encontradas en:
 1. los animales muertos o sacrificados durante el estudio, y
 2. los animales del grupo con dosis máxima y controles.
- b) Se examinarán también los órganos o tejidos de animales con dosis mínima que muestren anomalías causadas de forma indudable o posible por la sustancia objeto de estudio.
- c) Cuando el resultado de la prueba indique una reducción sustancial del período vital de los animales o la inducción de efectos capaces de influir en la respuesta tóxica, se someterá al examen citado en el párrafo anterior a los animales tratados con la dosis inmediatamente inferior.
- d) Es indispensable disponer de información sobre la incidencia de las lesiones que afectan normalmente a la cepa de animales en condiciones iguales a las de la prueba (es decir, datos de control publicados) para evaluar correctamente el significado de las modificaciones observadas en los animales tratados.

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa.

⁽³⁾ Estos órganos, de diez animales por sexo y grupo en los roedores y de todos los no roedores, se pesarán, lo mismo que la tiroides (con las paratiroides) de todos los roedores.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. **Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba:
 - Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.
 - Datos de exposición: Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:
 - a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación
 - b) temperatura y humedad del aire
 - c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)
 - d) naturaleza del vehículo, si se emplea
 - e) concentraciones reales en la zona de respiración
 - f) dimensiones medias de las partículas (si procede)
- dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis
- dosis carente de efectos
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- hallazgos oftalmológicos
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 31

ESTUDIO DE TERATOGENICIDAD: ROEDORES Y NO ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis o concentraciones diferentes, al menos durante la parte de la gestación en que tiene lugar la organogénesis, a varios grupos de animales de experimentación grávidos, a razón de una dosis por grupo. Poco antes de la fecha de parto prevista, se sacrifica a la madre, se extrae el útero y se examina su contenido. Este método de prueba investiga la embriotoxicidad y la toxicidad fetal.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Hembras jóvenes adultas y sanas vírgenes, de edad y tamaño semejantes, se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante al menos 5 días antes de la prueba. Posteriormente son apareadas con machos de fertilidad comprobada, tras lo cual se distribuirán al azar para formar grupos de tratamiento y de control.

La sustancia estudiada se administra a diario a las hembras desde poco después de la implantación y durante el período de la organogénesis. Un día antes del término, se extraen por histerectomía los fetos y se examinan en busca de anomalías viscerales o esqueléticas, incluidos retraso del crecimiento, osificación tardía y hemorragias intestinales.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Las especies de uso habitual son la rata, el ratón, el hámster y el conejo. Las preferidas son la rata y el conejo. Se utilizarán cepas de laboratorio de uso habitual. La cepa no debe ser de fecundidad escasa, y se caracterizará por su respuesta a los agentes teratógenos. Se alojará a los animales en jaulas individuales.

Número y sexo

Son necesarias para cada dosis al menos 20 ratas, ratones o hámsteres grávidas o 12 conejas grávidas. El objetivo es conseguir un número de camadas y crías suficiente para permitir una evaluación del potencial teratógeno de la sustancia.

Dosis

Deben emplearse al menos tres niveles posológicos y un control. Cuando se administre la sustancia estudiada en un vehículo, se utilizará también un grupo de control de éste. Si se emplea vehículo, han de conocerse sus propiedades toxicológicas; no deberá ser teratógeno ni ejercer efectos sobre la reproducción. Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo o grupos de control recibirán un trato idéntico al de los integrantes del

grupo de prueba. A menos que lo impidan la naturaleza física/química o las propiedades biológicas de la sustancia, lo ideal sería que la dosis más alta provocara cierta toxicidad materna manifiesta, en forma, por ejemplo, de una leve pérdida de peso, pero no más de un 10 % de muertes maternas. La dosis más baja no generará efectos observables atribuibles a la sustancia objeto de estudio. La o las dosis intermedias se situarán geoméricamente entre las mayores y las más bajas.

Prueba de límite

Cuando se trate de sustancias de escasa toxicidad, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce indicios de embriotoxicidad o teratogénesis, pueden considerarse innecesarios los estudios con otras dosis.

Período de exposición

Se considerará día 0 de la prueba aquél en que se observe la presencia de tapón vaginal, esperma o ambos (cuando sea posible). El período de administración abarcará la etapa principal de la organogénesis, que serían los días 6-15 en la rata y el ratón, 6-14 en el hámster y 6-18 en el conejo. Si se toma por día 0 el de la observación del apareamiento, o el de la inseminación artificial, habrá que añadir 1 día a los plazos indicados. Otra posibilidad es la de ampliar el período de administración hasta aproximadamente 1 día antes de la fecha de parto prevista.

Período de observación

Es preciso practicar una exploración física detenida al menos una vez al día. Se efectuarán diariamente observaciones complementarias, y se adoptarán medidas para reducir al mínimo la pérdida de animales del estudio.

Procedimiento

La sustancia objeto de estudio se administra oralmente por alimentación forzada. Deberá darse aproximadamente a la misma hora todos los días.

Los animales hembras reciben diariamente la sustancia ensayada durante el período de tratamiento apropiado. La dosis puede basarse en el peso de las hembras al principio de la administración de la sustancia; dado el rápido aumento de peso que experimentan durante la gestación, también cabe la posibilidad de pesar a los animales periódicamente para adaptar la dosis al último peso obtenido. Se registrarán, según se observen, los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Las hembras que muestren signos de aborto o parto prematuro se sacrificarán y someterán a un examen macroscópico completo. La observación postratamiento continuará hasta aproximadamente 1 día antes del término; el objetivo es cubrir la mayor parte del período de gestación, pero evitar complicar la interpretación de los resultados como consecuencia de partos naturales. Entre las observaciones realizadas deben figurar (aunque no de modo exclusivo) las de modificaciones de la piel y el pelo, ojos y membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento y el peso de los animales.

Autopsia

En el momento de la muerte durante el estudio, o al final de él, se examinará macroscópicamente a la hembra en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas que puedan haber influido en la gestación. Inmediatamente después del fallecimiento, se extirpará el útero, cuyo contenido se examinará para investigar las muertes embrionarias o fetales y el número de fetos vivos. Suele ser posible calcular el momento de la muerte *in utero* cuando se ha producido. En ratas y conejos es posible determinar el número de cuerpos lúteos. Se determinarán el sexo y el peso de cada feto; con los datos recogidos, se calculará el peso fetal medio. Tras la extracción, se someterá a cada feto a examen externo. En ratas, ratones y hámsteres, se prepararán y examinarán en busca de anomalías esqueléticas del 30 al 50 % de los animales de cada camada, en tanto que el resto de los integrantes de las camadas se prepararán y examinarán mediante métodos apropiados en busca de anomalías de los tejidos blandos. En el caso de los conejos, se examinará cada feto mediante disección cuidadosa en busca de anomalías viscerales y, a continuación, se comprobará si existen anomalías esqueléticas.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del estudio, el de los grávidos, el número y porcentajes de los fetos vivos y los fetos con anomalías esqueléticas y de los tejidos blandos y su relación con camadas específicas.

Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

- indicación del grado de absorción y excreción con el tiempo
- métodos de caracterización e identificación de los metabolitos en muestras biológicas
- métodos de las determinaciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo
- vías de metabolismo propuestas
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 32
ENSAYO DE CARCINOGENESIS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia objeto de estudio se administra normalmente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad, y en particular la aparición de tumores.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos cinco días previos a la prueba. Antes de comenarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

Animales de experimentación

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (de roedores y no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 100 animales (50 hembras y 50 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nulíparas y no grávidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

Dosis y frecuencia de exposición

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos de toxicidad mínimos, como una leve disminución de la ganancia de peso corporal (inferior al 10%), sin alterar de manera notable la duración normal de la existencia a causa de efectos distintos de tumores.

La dosis más baja no debe alterar el crecimiento, el desarrollo ni la longevidad normales del animal, ni generar indicio alguno de toxicidad. En general, no será inferior al 10% de la dosis alta.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Normalmente, la exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgente de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará otro grupo de control que no se expondrá al vehículo.

Vía de administración

Las tres vías de administración principales son la oral, la dérmica y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

Estudios orales

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, y si la ingestión es una vía posible de exposición humana, se preferirá la vía oral de administración, salvo si existen contraindicaciones. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas.

Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis semanales es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el período exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios dérmicos

Es posible optar por la exposición cutánea mediante aplicación sobre la piel con un pincel para simular una vía importante de exposición del ser humano, así como modo de sistema modelo para la inducción de lesiones cutáneas.

Estudios de inhalación

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales cinco días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los siete días de la semana (exposición permanente) a una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de la sustancia objeto de estudio.

Una diferencia es que con la primera existe un período de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un período de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de técnicas de control más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición:

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la

sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5% del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

- (i) Flujo de aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.
- (ii) Concentración: durante el período diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del $\pm 15\%$ del valor medio. Durante todo el estudio, las concentraciones se mantendrán lo más constantes posible de un día a otro.
- (iii) Temperatura y humedad: en roedores, la temperatura se mantendrá a 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70%, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.
- (iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de él no sea respirable. Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

Una prueba de carcinogénesis debe abarcar la mayor parte del período de existencia de los animales a ella sometidos: 18 meses en ratones y hámsteres y 24 meses en ratas; sin embargo, en determinadas cepas de animales de mayor longevidad o índice de tumoración espontánea bajo, se prolongará hasta 24 meses en ratones y hámsteres y hasta 30 en ratas. También es posible dar por concluido un estudio ampliado cuando el número de supervivientes en el grupo con dosis más baja o de control alcance el 25%. Cuando en una prueba se observen respuestas aparentemente diferentes en cada sexo, se les estudiará por separado. Si sólo fallecieran prematuramente los animales del grupo con dosis alta, por causas evidentes de toxicidad, no es obligada la conclusión del estudio, siempre y cuando las manifestaciones tóxicas no provoquen problemas en los demás grupos. Para considerar aceptable una prueba negativa, es preciso que no se pierda más del 10% de los animales de cualquier grupo por causa de autólisis, canibalismo o problemas de organización, y que la supervivencia en todos los grupos no sea inferior al 50%, en ratones y hámsteres a los 18 meses y a los 24 en ratas.

Procedimiento

Observaciones

Las observaciones diarias de los animales en sus jaulas deben incluir los cambios en la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento.

Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno de ellos por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

Se registrarán los signos clínicos y la mortalidad para todos los animales. Ha de prestarse una atención especial a la tumorogénesis; se registrarán el momento de aparición y la localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.

Se determinará el consumo de alimento (y el de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) semanalmente durante las 13 primeras semanas del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo si aconsejara otra cosa el estado de salud o las alteraciones del peso corporal.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del período de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad.

Exámenes clínicos

Hematología

Si las observaciones indicaran un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se determinará la fórmula leucocitaria de los animales afectados.

A los 12 y 18 meses y antes del sacrificio, se obtiene de los animales un frotis sanguíneo. Se determinará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales de los grupos con dosis máxima y de control. Si estos datos, especialmente los obtenidos antes del sacrificio, o los obtenidos del examen histopatológico así lo aconsejan, se determinarán también las fórmulas leucocitarias en el grupo o grupos inmediatamente inferiores.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Se conservarán todos los tumores o lesiones macroscópicas visibles, así como las lesiones que se sospeche son tumores.

Se conservarán en medios adecuados para un posible examen histopatológico los órganos y tejidos siguientes: cerebro (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, paratiroides, timo, pulmones y tráquea, corazón, aorta, glándulas salivares, hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, órganos genitales secundarios, piel, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio infático representativo, glándula mamaria femenina, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea, fémur (incluida articulación) y ojos.

El inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el medio óptimo de conservación de estos tejidos; por otro lado, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se estudiará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Examen histopatológico

- a) Se realizará un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos de todos los animales fallecidos o sacrificados durante la prueba, y de los miembros de los grupos de control y con la dosis máxima.
- b) Se examinarán al microscopio en todos los grupos todos los tumores macroscópicos visibles o las lesiones que se sospeche son tumores.
- c) Si existe una diferencia significativa en la incidencia de lesiones neoplásicas entre el grupo con dosis máxima y el de control, se practicará un examen histopatológico sobre el órgano o tejido de que se trate en los demás grupos.
- d) Si la supervivencia del grupo con dosis máxima es notablemente inferior a la observada en el de control, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.
- c) Si se apreciaran en el grupo con dosis máxima indicios de la inducción de efectos tóxicos o de otro tipo capaces de influir en una respuesta neoplásica se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que han mostrado tumores apreciables durante el mismo, el momento del descubrimiento y el número de animales en que se encontraron tumores después del sacrificio. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

— condiciones de la prueba:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

Datos de exposición:

Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

- a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación
 - b) temperatura y humedad del aire
 - c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)
 - d) naturaleza del vehículo, si se emplea
 - e) concentraciones reales en la zona de respiración
 - f) dimensiones medias de las partículas (si procede)
- dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones
- datos de la incidencia de tumores en función del sexo, la dosis y el tipo tumoral
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, con descripción de los métodos empleados
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B. 33

ENSAYO COMBINADO DE TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGENESIS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El objetivo de una prueba combinada de toxicidad crónica y carcinogénesis es determinar los efectos crónicos y cancerígenos de una sustancia en una especie de mamífero tras exposición prolongada.

A este fin, se completa una prueba de carcinogénesis con un grupo satélite tratado y otro de control, por lo menos. La dosis empleada para el grupo satélite con dosis máxima puede ser superior a la utilizada para idéntico grupo en la prueba de carcinogénesis. Los animales de la prueba de carcinogénesis se examinan tanto en busca de signos de toxicidad general como de una respuesta cancerígena. Los animales del grupo satélite tratado se examinan en busca de signos de toxicidad general.

La sustancia objeto de estudio se administra normalmente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

Animales de experimentación

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (roedores o no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 100 animales (50 hembras y 50 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nulíparas y no grávidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

El grupo o grupos satélites tratados para la evaluación de alteraciones patológicas distintas de los tumores contendrán 20 animales de cada sexo, en tanto que el grupo de control satélite constará de 10 animales de cada sexo.

Dosis y frecuencia de exposición

Para el estudio de la carcinogénesis se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos de toxicidad mínima, como una disminución en la ganancia de peso corporal (inferior al 10%), sin alterar en medida notable la duración normal de la existencia por causa de efectos distintos de tumores.

La dosis más baja no debe alterar el crecimiento, el desarrollo ni la longevidad normales del animal, ni generar indicio alguno de toxicidad. En general, no será inferior al 10% de la dosis máxima.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Para estudiar la toxicidad crónica, se incluirán en la prueba grupos tratados adicionales y un grupo satélite de control correspondiente. La dosis máxima de los animales satélites tratados producirá signos definidos de toxicidad.

Normalmente, la frecuencia de exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgente de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará también un grupo de control negativo concurrente. Este grupo de control negativo se tratará de igual manera que los grupos de prueba, salvo en que los animales no se expondrán a la sustancia estudiada ni a ningún vehículo.

Vía de administración

Las tres vías de administración principales son la oral, la dérmica y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

Estudios orales

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, se preferirá la vía oral de administración. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas.

Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis a la semana es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el período exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios dérmicos

Es posible optar por la exposición cutánea mediante aplicación sobre la piel con un pincel para simular una vía importante de exposición del ser humano, así como a modo de sistema modelo para la inducción de lesiones cutáneas.

Estudios de inhalación

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales 5 días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los 7 días de la semana (exposición permanente) a una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de la sustancia objeto de estudio. Una diferencia importante entre la exposición intermitente y la permanente es que con la primera existe un período de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un período de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de técnicas de control, más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

- (i) Flujo del aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.
- (ii) Concentración: durante el período diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del $\pm 15\%$ del valor medio.
- (iii) Temperatura y humedad: en roedores, la temperatura se mantendrá a 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70%, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.
- (iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de éste no sea respirable. Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

La parte de la prueba dedicada a la carcinogénesis debe abarcar la mayor parte del período de existencia de los animales a ella sometidos: 18 meses en ratones y hámsteres, y 24 meses en ratas; sin embargo, en determinadas cepas de animales de mayor longevidad o de índice de tumoración espontánea bajo, se prolongará hasta los 24 meses en ratones y hámsteres, y los 30 en ratas. También es posible dar por concluido un estudio ampliado cuando el número de supervivientes en el grupo con dosis más baja o de control alcance el 25 %. Cuando en una prueba se observen respuestas aparentemente diferentes en cada sexo, se les estudiará por separado. Si sólo fallecieran prematuramente los animales del grupo con dosis alta por causas evidentes de toxicidad, no es obligada la conclusión del estudio, siempre y cuando las manifestaciones tóxicas no provoquen problemas en los demás grupos. Para considerar aceptable una prueba negativa, es preciso que no se pierda más del 10 % de los animales de cualquier grupo por causa de autólisis, canibalismo o problemas de organización, y que la supervivencia en todos los grupos no sea inferior al 50 % a los 18 meses en ratones y hámsteres, y a los 24 en ratas.

Los grupos satélites de 20 animales tratados por sexo y 10 animales de control asociados por sexo, utilizados para estudiar la toxicidad crónica, se mantendrán en la prueba durante al menos 12 meses. Se programará el sacrificio de estos animales para determinar la posible existencia de patología relacionada con la sustancia estudiada y no complicada por alteraciones gerontológicas.

Procedimiento

Observaciones

Los animales deben observarse diariamente en sus jaulas, comprobando los cambios en la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas así como en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento.

Se efectuarán exploraciones clínicas a intervalos apropiados en los animales de los grupos satélites tratados.

Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

Se anotarán para todos los animales los signos clínicos, incluidas tanto las alteraciones neurológicas y oculares como la mortalidad. Ha de prestarse una atención especial a la tumorigénesis; se registrarán el momento de aparición y la localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópico o palpable; se registrarán asimismo el momento de comienzo y la evolución de los procesos tóxicos.

Se determinará el consumo de alimento (y el de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) semanalmente durante las 13 primeras semanas del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo si aconsejaren otra actitud el estado de salud o las alteraciones del peso corporal.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del período de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad.

Exámenes clínicos

Hematología

Se realizará un examen hematológico (p. ej., contenido de hemoglobina, hematocrito, recuentos de hematíes y leucocitos, plaquetas u otras medidas de la capacidad de coagulación) a los tres y los seis meses, después con intervalos aproximados de seis meses y, al final, sobre muestras de sangre recogidas de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos. A ser posible, las muestras procederán de las mismas ratas en cada intervalo.

Si las observaciones clínicas indican un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se practicará un recuento con fórmula leucocitaria de los animales afectados.

Se averiguará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales del grupo con dosis máxima y de los controles. Sólo se determinará en los grupos con dosis menores si se aprecia una discrepancia importante entre el grupo con dosis máxima y los controles, o si lo aconsejan los hallazgos patológicos.

Análisis de orina

Se recogerán para su análisis muestras de orina de todos los animales no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas que sirvan para el examen hematológico y respetando intervalos idénticos. Se realizarán las determinaciones siguientes en animales individuales, o en una muestra acumulada sexo/grupo en el caso de los roedores:

- aspecto: volumen y densidad en cada animal
- proteínas, glucosa, cetonas, sangre oculta (semicuantitativamente)
- microscopía del sedimento (semicuantitativamente).

Bioquímica

Con intervalos aproximados de 6 meses y a la conclusión, se extraen muestras de sangre para determinaciones de bioquímica de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas en cada intervalo. Además, se recogerá en todos los no roedores una muestra previa a la prueba. Se prepara plasma a partir de estas muestras, y se realizan las determinaciones siguientes:

- concentración de proteínas totales
- concentración de albúmina
- pruebas de función hepática (como actividad de fosfatasa alcalina, transaminasa glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y transaminasa glutamicoxaloacética ⁽²⁾, gammaglutamiltranspeptidasa, ornitindecarboxilasa
- metabolismo de carbohidratos, como glucemia en ayunas
- pruebas de función renal, como nitrógeno ureico en sangre.

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Antes del sacrificio, se recogerán de todos los animales muestras de sangre para la realización de recuentos sanguíneos con fórmula leucocitaria. Se conservarán todas las lesiones macroscópicas visibles, así como los tumores o lesiones que se sospeche son tumores. Se intentarán relacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

Se conservarán para examen histopatológico todos los órganos y tejidos, habitualmente los siguientes: cerebro ⁽¹⁾ (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, (incluida paratiroides), timo, pulmones (incluida tráquea), corazón, aorta, glándulas salivares, hígado ⁽¹⁾, bazo, riñones ⁽¹⁾, suprarrenales ⁽¹⁾, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, ileon, ciego, colon, recto, útero, vejiga urinaria, ganglios linfáticos, páncreas, gónadas ⁽¹⁾, órganos genitales accesorios, glándula mamaria femenina, piel, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea y fémur (incluida articulación) y otros.

Aunque el inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el método óptimo de conservación de estos tejidos, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se examinará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Si se realizan otros exámenes clínicos, la información con ellos obtenida deberá estar disponible antes del examen microscópico, ya que puede suponer una orientación importante para el anatomopatólogo.

Examen histopatológico

En el apartado de toxicidad crónica:

Se practicará un examen detallado de los órganos conservados de todos los animales de los grupos satélites con dosis máxima y de control. Si se encontrara patología relacionada con la sustancia estudiada en el grupo satélite con dosis máxima, se someterán a un examen histopatológico completo y detallado los órganos efectores de los demás animales de cualquier otro grupo satélite tratado, así como los de los grupos tratados del apartado de carcinogénesis del estudio, a la conclusión de éste.

En el apartado de carcinogénesis:

- a) Se realizará un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos de todos los animales fallecidos o sacrificados durante la prueba, y de los miembros de los grupos de control y con la dosis máxima.
- b) Se examinarán al microscopio, en todos los grupos, todos los tumores macroscópicos visibles o las lesiones, que se sospeche son tumores, aparecidas en cualquier órgano.
- c) Si existe una diferencia significativa en la incidencia de lesiones neoplásicas entre el grupo con dosis máxima y el de control, se practicará un examen histopatológico sobre el órgano, o tejido de que se trate, en los demás grupos.
- d) Si la supervivencia del grupo con dosis máxima es notablemente inferior a la observada en el de control, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.
- e) Si se apreciaran en el grupo con dosis máxima indicios de la inducción de efectos tóxicos, o de otro tipo, capaces de influir en una respuesta neoplásica, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que han mostrado tumores apreciables durante el mismo, el momento del descubrimiento y el número de animales en que se encontraron tumores después del sacrificio.

Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

⁽¹⁾ Se pesarán estos órganos, de diez animales por sexo y grupo de roedores.

— condiciones de la prueba:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

Datos de exposición:

Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

- a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación
- b) temperatura y humedad del aire
- c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)
- d) naturaleza del vehículo, si se emplea
- e) concentraciones reales en la zona de respiración
- f) dimensiones medias de las partículas (si procede)

— dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones

— datos de la incidencia de tumores en función del sexo, la dosis y el tipo tumoral

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia

— datos de la respuesta tóxica, por sexo y dosis

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo

— momento de observación de cada signo anómalo y evaluación de éste

— hallazgos oftalmológicos

— datos sobre alimentación y peso

— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos

— pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)

— hallazgos de autopsia

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 34
ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis crecientes, a varios grupos de machos y hembras. Los machos deberán tratarse en la fase de crecimiento y durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 días en la rata) para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en la espermatogénesis.

Las hembras de la generación parental (P) recibirán tratamiento durante dos ciclos estrales completos, por lo menos, para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en el estro. A continuación, se apareará a los animales. La sustancia ensayada se administra a los dos sexos durante el período de apareamiento, y luego únicamente a las hembras en los períodos de gestación y lactancia. El método deberá modificarse si se pretende administrar la sustancia por inhalación.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Antes de la prueba, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Los animales se mantienen en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Se recomienda la administración de la sustancia estudiada con la alimentación o en el agua de bebida, pero también son aceptables otras vías de administración. Todos los animales se tratarán por el mismo método durante el período experimental apropiado. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, éstos no deberán ser tóxicos. Se administrará la sustancia los 7 días de la semana.

Animales de experimentación

Las especies preferidas son la rata y el ratón. Han de utilizarse animales sanos, no sometidos a experimentación previa. No se utilizarán cepas de baja fecundidad. Se especificará la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales empleados.

Para evaluar debidamente la fecundidad, se estudiará tanto a los machos como a las hembras. Todos los animales tratados y de control deberán estar destetados antes del comienzo del tratamiento.

Número y sexo

Cada grupo tratado y de control comprenderá un número de animales suficiente para obtener unas 20 hembras grávidas a término o cerca de él.

El objetivo es conseguir gestaciones y prole suficientes para permitir una evaluación significativa de la influencia de la sustancia en la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno de los animales de la generación P así como en la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de la generación F₁ desde la concepción al destete.

Condiciones del ensayo

Se suministrarán alimento y agua *ad libitum*. Al acercarse el momento del parto, se aislará a las hembras grávidas en jaulas individuales para partos o de maternidad, y pueden suministrárseles materiales de nidificación.

Dosis

Se utilizarán al menos tres grupos tratados y uno de control. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia probada, el grupo de control recibirá este vehículo en el volumen máximo empleado. Si una sustancia objeto de estudio causa una reducción de la ingesta o del aprovechamiento de la alimentación, puede considerarse necesario el uso de un grupo de control emparejado. Lo ideal sería que, a menos que lo impidan la naturaleza física/química, o los efectos biológicos de la sustancia estudiada, la dosis máxima provoque toxicidad, pero no mortalidad, en los animales paternos (P). La o las dosis intermedias generarán efectos tóxicos mínimos atribuibles a la sustancia ensayada, y la dosis mínima no inducirá efectos adversos observables ni en los progenitores ni en la descendencia. Cuando la sustancia se administre por alimentación forzada o en cápsulas, la dosis dada a cada animal deberá basarse en el peso de cada uno y adaptarse semanalmente a las modificaciones que experimente. En las hembras grávidas, el tratamiento puede establecerse, si se desea, en función del peso corporal en el día 0 ó 6 de gestación.

Prueba de límite

Cuando se trate de una sustancia de toxicidad escasa, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce signo de alteración del rendimiento reproductor, serán necesarios estudios con otras dosis. Si un estudio preliminar con la dosis máxima muestra signos claros de toxicidad materna, pero ningún efecto adverso en la fertilidad, serán necesarios estudios con otras dosis.

Procedimiento

Planes experimentales

La administración diaria de la sustancia a los progenitores machos (P) se iniciará cuando tengan unas 5 a 9 semanas de edad, previo destete y aclimatación durante al menos 5 días. En las ratas, el tratamiento continúa durante 10 semanas antes del período de apareamiento (8 semanas en ratones). Los machos se sacrificarán y examinarán al final del período de apareamiento, o bien se les mantendrá con vida y en tratamiento por si se considerara conveniente la producción de una segunda camada; se les sacrificará y examinará en algún momento antes de finalizar el estudio. En las hembras progenitoras (P), la administración se iniciará después de cinco días de aclimatación, por lo menos, y continuará durante al menos dos semanas antes del apareamiento. El tratamiento diario de las hembras P proseguirá durante todo el período de apareamiento de 3 semanas, en la gestación y hasta el destete de la generación F₁. Cabe considerar la introducción de modificaciones del esquema posológico si se dispone de otros datos sobre la sustancia estudiada, como la inducción del metabolismo o la bioacumulación.

Método de apareamiento

En los estudios de toxicidad para la reproducción puede utilizarse apareamiento 1:1 (1 macho con 1 hembra) o 1:2 (1 macho con 2 hembras).

Si el apareamiento es 1:1, cada hembra se colocará con el mismo macho hasta que exista gestación o hayan transcurrido tres semanas. Se examinará todas las mañanas a las hembras para determinar la presencia de esperma o tapones vaginales. Se considera día 0 de la gestación aquél en que se encuentre un tapón vaginal o esperma.

Las parejas que no se apareen se examinarán para determinar la causa de la infertilidad aparente. Para ello, cabe recurrir a métodos como nuevas oportunidades de aparearse con machos o hembras que ya hayan procreado, examen microscópico de los órganos reproductores y examen del ciclo estral o de la espermatogénesis.

Tamaño de la camada

Se permitirá a los animales tratados durante el estudio de fertilidad parir naturalmente y criar a su camada libremente hasta el destete.

Cuando se recurra a un método de homogeneización de las camadas, se sugiere la técnica siguiente. Entre los días 1 y 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, cuatro machos y cuatro hembras por camada. Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (p. ej., cinco machos y tres hembras). Los ajustes no serán posibles con camadas de menos de ocho crías.

Observaciones

Se observará a cada animal al menos una vez al día durante la totalidad del período de prueba. Se anotarán los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. En los períodos de preapareamiento y de apareamiento, puede determinarse a diario el consumo de alimento. Tras el parto y durante la lactancia, se determinará el consumo de alimento (o de agua cuando la sustancia en estudio se administre en el agua de bebida) en los mismos días en que se pesen las camadas. Los machos y hembras P se pesarán el primer día de tratamiento, y luego semanalmente. Estas observaciones se anotarán por separado para cada animal adulto.

La duración de la gestación se calculará a partir del día 0 de gestación. Cada camada se examinará lo antes posible tras el alumbramiento para establecer el número y sexo de las crías, las nacidas muertas, las vivas y la presencia de anomalías macroscópicas.

Las crías muertas y las sacrificadas en el día 4 se conservarán y estudiarán en busca de posibles defectos. Se contarán las crías vivas y se pesarán las camadas la mañana siguiente al nacimiento, los días 4 y 7 siguientes y, por fin, semanalmente hasta la conclusión del estudio, momento en que debe pesarse por separado a los animales. Se registrarán las anomalías físicas o de conducta observadas en las madres o su progenie.

Patología

Autopsia

Cuando los animales de la generación P se sacrifiquen, o si han muerto a lo largo del estudio, se examinarán al microscopio en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas, prestando una atención especial a los órganos del sistema reproductor. Las crías muertas o moribundas se examinarán por si sufrieran malformaciones.

Examen histopatológico

Se conservarán para examen microscópico ovarios, útero, cérvix, vagina, testículos, epidídimos, vesículas seminales, próstata, glándula coagulante, hipófisis y órganos efectores de todos los animales P. En caso de que estos órganos no se hayan examinado en otros estudios con varias dosis, se estudiarán al microscopio en todos los animales con dosis máxima y en los controles y en los animales que mueran durante el estudio, siempre que sea posible.

Se examinarán entonces, en todos los demás animales P, los órganos que muestren anomalías en aquéllos. En estos casos, se practicará examen microscópico de todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas macroscópicas. Como se ha indicado al exponer los métodos de apareamiento, pueden someterse a examen microscópico los órganos reproductores de los animales que se sospeche sufren esterilidad.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de machos fértiles, el de hembras grávidas, los tipos de alteraciones y el porcentaje de animales que mostraban cada alteración.

Cuando sea posible, los resultados numéricos se enumerarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie y cepa utilizada
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis, incluidos los índices de fertilidad, gestación y viabilidad

- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron hasta el día previsto para el sacrificio al final del estudio
- tabla en la que aparezcan los pesos de cada camada, los pesos medios de las crías y los pesos de las distintas crías tras concluir el estudio
- efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie y el crecimiento postnatal
- día de observación de cada signo anómalo y su evolución
- datos de peso de los animales P
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de todos los hallazgos microscópicos
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 35
ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN DOS GENERACIONES

1. **MÉTODO**

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis crecientes, a varios grupos de machos y hembras. Los machos de la generación paterna (P) deberán tratarse en la fase de crecimiento y durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 días en la rata) para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en la espermatogénesis.

Las hembras de la generación parental (P), recibirán tratamiento durante dos ciclos estrales completos, por lo menos; para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso sobre el estro. A continuación, se aparean a los animales. La sustancia ensayada se administra a los dos sexos durante el período de apareamiento, y luego únicamente a las hembras en los períodos de gestación y lactancia. Tras el destete, continúa la administración de la sustancia a la descendencia F₁ durante su crecimiento hasta la edad adulta, su apareamiento y producción de una generación F₂, hasta el destete de esta generación F₂. El método deberá modificarse si se pretende administrar la sustancia por inhalación.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Antes de la prueba, se distribuyen al azar los animales sanos para formar grupos de tratamiento y de control. Los animales P se mantienen en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Se recomienda la administración de la sustancia estudiada con la alimentación o en el agua de bebida, pero también son aceptables otras vías de administración. Todos los animales se tratarán por el mismo método durante la totalidad del período experimental. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, éstos no deberán ser tóxicos. Se administrará la sustancia los 7 días de la semana.

Animales de experimentación: selección de la especie

Las especies preferidas son la rata y el ratón. Han de utilizarse animales P sanos no sometidos a experimentación previa. No se utilizarán cepas de baja fecundidad. Se especificará la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales empleados.

Para evaluar debidamente la fecundidad, se estudiará tanto a los machos como a las hembras. Todos los animales tratados y de control deberán estar destetados antes del comienzo del tratamiento.

Número y sexo

Cada grupo tratado y de control comprenderá un número de animales suficiente para obtener unas 20 hembras grávidas a término o cerca de él. El objetivo es conseguir gestaciones y prole suficientes para permitir una evaluación significativa de la influencia de la sustancia en la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno, y

de la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de la generación F_1 desde la concepción a la madurez, así como del desarrollo de su descendencia (F_2) hasta el destete.

Condiciones del ensayo

Se suministrarán alimento y agua *ad libitum*. Al acercarse el momento del parto, se aislará a las hembras grávidas en jaulas individuales para partos o de maternidad, y pueden administrárseles materiales de nidificación.

Dosis

Se utilizarán al menos tres grupos tratados y uno de control. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia probada, el grupo de control recibirá este vehículo en el volumen máximo empleado. Si una sustancia objeto de estudio causa una reducción de la ingesta o del aprovechamiento de la alimentación, puede considerarse necesario el uso de un grupo de control emparejado. Lo ideal sería que, a menos que lo impidan la naturaleza física/química o los efectos biológicos de la sustancia estudiada, la dosis máxima provoque toxicidad, pero no mortalidad, en los animales paternos (P). La o las dosis intermedias generarán efectos tóxicos mínimos atribuibles a la sustancia ensayada, y la dosis mínima no inducirá efectos adversos observables ni en los progenitores ni en la descendencia. Cuando la sustancia se administre por alimentación forzada o en cápsulas, la dosis dada a cada animal deberá basarse en el peso de cada uno, y adaptarse semanalmente a las modificaciones que experimente. En las hembras grávidas, el tratamiento puede establecerse, si se desea, en función del peso corporal en el día 0 ó 6 de gestación.

Prueba de límite

Cuando se trate de una sustancia de toxicidad escasa, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce signo alguno de alteración del rendimiento reproductor, son innecesarios estudios con otras dosis. Si un estudio preliminar con la dosis máxima muestra signos claros de toxicidad materna, pero ningún efecto adverso en la fertilidad, son innecesarios estudios con otras dosis.

Procedimiento

Planes experimentales

La administración diaria de la sustancia a los progenitores machos (P) se iniciará cuando tengan unas 5 ó 9 semanas de edad, previo destete y aclimatación durante al menos 5 días. En las ratas, el tratamiento continúa durante 10 semanas antes del período de apareamiento (8 semanas en ratones). Los machos se sacrificarán y examinarán al final del período de apareamiento, o bien se les mantendrá con vida y en tratamiento por si se considera conveniente la producción de una segunda camada; se sacrificarán y examinarán en algún momento antes de finalizar el estudio.

En las hembras progenitoras (P), la administración se iniciará después de cinco días de aclimatación por lo menos, y continuará durante al menos dos semanas antes del apareamiento. El tratamiento diario de las hembras P proseguirá durante todo el período de apareamiento de 3 semanas, en la gestación y hasta el destete de la generación F_1 .

Cabe considerar la introducción de modificaciones del esquema posológico si se dispone de otros datos sobre la sustancia estudiada, como la inducción del metabolismo o la bioacumulación.

El tratamiento de los animales F_1 se iniciará con el destete, y terminará cuando se sacrifiquen.

Método de apareamiento

En los estudios de toxicidad para la reproducción puede utilizarse apareamiento 1:1 (1 macho con 1 hembra) o 1:2 (1 macho con 2 hembras).

Si el apareamiento es 1:1, cada hembra se colocará con el mismo macho hasta que exista gestación o hayan transcurrido tres semanas. Se examinará todas las mañanas a las hembras para determinar la presencia de esperma o tapones vaginales. Se considera día 0 de la gestación aquél en que se encuentre un tapón vaginal o esperma. Habida cuenta de la espermatogénesis, la generación F_1 no se apareará hasta que tenga por lo menos 11 semanas si son ratones, o 13 si son ratas. Para el apareamiento de la generación F_1 , se seleccionan al azar un macho y una hembra de cada camada para apareamiento cruzado con una cría de otra camada del mismo grupo de tratamiento, con objeto de producir la generación F_2 . Los machos y hembras F_1 no seleccionados para apareamiento se sacrificarán al destete.

Las parejas que no se apareen se examinarán para determinar la causa de la infertilidad aparente. Para ello, cabe recurrir a métodos como nuevas oportunidades de aparearse con machos o hembras que ya hayan procreado, examen microscópico de los órganos reproductores y examen del ciclo estral o de la espermatogénesis.

Tamaño de la camada

Se permitirá a los animales tratados durante el estudio de fertilidad parir naturalmente y criar su camada libremente hasta el destete.

Cuando se recurra a un método de homogeneización de las camadas, se sugiere emplear la técnica siguiente. Entre los días 1 y 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, cuatro machos y cuatro hembras por camada. Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (p. ej., cinco machos y tres hembras). Los ajustes no serán posibles con camadas de menos de ocho crías. Las camadas F_2 se ajustan de la misma manera.

Observaciones

Se observará a cada animal al menos una vez al día durante la totalidad del período de prueba. Se anotarán los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. En los períodos de preapareamiento y apareamiento, puede determinarse semanalmente el consumo de alimento. Opcionalmente, cabe medirlo a diario. Tras el parto y durante la lactancia se determinará el consumo de alimento en los mismos días en que se pesen las camadas. Los animales progenitores (P y F_1) se pesarán el primer día de tratamiento, y luego semanalmente. Estas observaciones se anotarán por separado para cada animal adulto.

La duración de la gestación se calculará a partir del día 0 de gestación. Cada camada se examinará lo antes posible tras el alumbramiento para establecer el número y sexo de las crías, las nacidas muertas, las vivas y la presencia de anomalías macroscópicas.

Las crías muertas y las sacrificadas en el día 4 se conservarán y estudiarán en busca de posibles defectos. Se contarán las crías vivas y se pesarán las camadas la mañana siguiente al nacimiento, los días 4 y 7 siguientes y, por fin, semanalmente hasta la conclusión del estudio, momento en que debe pesarse por separado a los animales. Se registrarán las anomalías físicas o de conducta observadas en las madres o su progenie.

Patología

Autopsia

Todos los animales adultos P y F_1 se sacrificarán cuando ya no sean necesarios para evaluar los efectos en la reproducción. La descendencia F_1 , no seleccionada para apareamiento, y toda la generación F_2 se sacrificarán tras el destete.

Cuando todos los animales progenitores (P y F_1) se sacrifiquen o si han muerto a lo largo del estudio, se examinarán al microscopio en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas, prestando una atención especial a los órganos del sistema reproductor. Las crías muertas o moribundas se examinarán por si sufrieran malformaciones.

Examen histopatológico

Se conservarán para examen microscópico ovarios, útero, cérvix, vagina, testículos, epidídimos, vesículas seminales, próstata, glándula coagulante, hipófisis y órganos efectores de todos los animales P y F_1 . En caso de que estos órganos no se hayan examinado en otros estudios con varias dosis, se estudiarán al microscopio en todos los animales P y F_1 con dosis máxima y en los controles seleccionados para apareamiento y, siempre que sea posible, en los que mueran durante el estudio. Se examinarán entonces en todos los demás animales los órganos que muestren anomalías en aquellos animales. En estos casos, se practicará examen microscópico de todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas macroscópicas. Como se ha indicado el exponer los métodos de apareamiento, pueden someterse a examen microscópico los órganos reproductores de los animales que se sospeche sufren esterilidad.

2. **RESULTADOS**

Tratamiento de los resultados

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de animales grávidos, los tipos de alteraciones y el porcentaje de animales que mostraban cada alteración.

Cuando sea posible, se evaluarán los resultados numéricos por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. **Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie y cepa utilizada
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis, incluidos los índices de fertilidad, gestación y viabilidad
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron hasta su conclusión
- tabla en la que aparezcan los pesos de cada camada, los pesos medios de las crías y los pesos de las distintas crías tras concluir el estudio
- efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie y el crecimiento posnatal
- día de observación de cada signo anómalo y su evolución
- datos de peso de los animales P y F₁ seleccionados para apareamiento
- hallazgos de la autopsia
- descripción detallada de todos los hallazgos microscópicos
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B. 36
TOXICOCINÉTICA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia objeto de estudio se administra por una vía apropiada. Según el objetivo del estudio, puede administrarse en dosis única o repetida, durante períodos determinados, a uno o varios grupos de animales de experimentación. Con posterioridad, y en función del tipo de estudio, se determinan la sustancia, o sus metabolitos, o ambos en los líquidos, los tejidos o las excreciones corporales.

Pueden realizarse estudios con formas «marcadas» o «no marcadas» de la sustancia probada. Cuando se utilice el marcado, su posición en la sustancia debe suministrar la mayor información posible sobre el destino del compuesto.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se aclimatan animales jóvenes y sanos a las condiciones del laboratorio durante, al menos, cinco días previos a la prueba. Antes de ella, se distribuye al azar a los animales para formar grupos de tratamiento. En casos especiales pueden emplearse animales muy jóvenes, grávidos o tratados previamente.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Los estudios toxicocinéticos pueden efectuarse en una o varias especies animales apropiadas; se tendrán en cuenta las especies utilizadas o que esté previsto utilizar en otros estudios toxicológicos con la misma sustancia. Cuando se empleen roedores en una prueba, la variación ponderal no será superior al $\pm 20\%$ del peso medio.

Número y sexo

Para estudios de absorción y excreción, cada grupo contendrá inicialmente 4 animales. No es necesaria la elección de un sexo determinado, pero en ciertas circunstancias puede ser preciso estudiar ambos sexos. Si se apreciaran respuestas diferentes según el sexo, se estudiarán cuatro animales de cada uno. Cuando los estudios se hagan con no roedores, pueden utilizarse menos animales.

Si se estudia la distribución en los tejidos, al considerar el tamaño del grupo inicial se tendrán en cuenta el número de animales que se sacrificarán en cada fecha de examen establecida y el número de exámenes.

Cuando se estudie el metabolismo, el tamaño del grupo estará acorde con las necesidades del estudio.

En los estudios con varias dosis y exámenes intermedios, al considerar el tamaño del grupo se tendrá en cuenta el número de exámenes y de sacrificios previstos; no obstante, estará formado por al menos dos animales. El tamaño del grupo será suficiente para permitir una evaluación aceptable del aumento, la estabilización y la reducción (según convenga) de las concentraciones de la sustancia estudiada, de sus metabolitos o de ambos.

Dosis

Cuando se administre una sola dosis, se utilizarán al menos dos niveles posológicos: una dosis baja con la que no se observen efectos tóxicos, y otra alta capaz de producir modificaciones de los parámetros toxicocinéticos o efectos tóxicos.

Si se administran dosis reiteradas, suele bastar la dosis baja, aunque en circunstancias determinadas quizá sea necesaria también una dosis alta.

Vía de administración

Los estudios toxicocinéticos se efectuarán por medio de la misma vía y, cuando convenga, del mismo vehículo empleado o que esté previsto emplear en los demás estudios de toxicidad. La sustancia analizada suele administrarse oralmente por alimentación forzada o en el alimento, aplicarse a la piel o administrarse por inhalación durante períodos definidos a grupos de animales de experimentación. La administración intravenosa de la sustancia puede ser útil para determinar la absorción relativa por otras vías. Además, es posible obtener información útil sobre el patrón de distribución poco después de la administración intravenosa de una sustancia.

Se tendrá presente la posibilidad de una interferencia del vehículo con la sustancia estudiada. Se prestará atención a las diferencias de absorción entre la administración de las sustancias analizadas por alimentación forzada y en el alimento y la necesidad de una determinación exacta de la dosis, sobre todo cuando se administre el compuesto en el alimento.

Período de observación

Se observará a diario a todos los animales, se registrarán los signos de toxicidad y otros rasgos clínicos relevantes, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración de los mismos.

Procedimiento

Después de pesar a los animales, se administra la sustancia objeto de estudio por una vía apropiada. Si se considera oportuno, puede mantenerse a los animales en ayunas antes de la administración de la sustancia.

Absorción

El índice y el grado de absorción de la sustancia administrada pueden valorarse por métodos diversos, con grupos de referencia⁽¹⁾ o sin ellos, por ejemplo mediante:

- determinación de la cantidad de la sustancia estudiada, de sus metabolitos o de ambos en las excretas, como orina, bilis, heces, aire espirado y el contenido en el caparazón
- comparación de la respuesta biológica (p. ej., estudios de toxicidad aguda) entre los grupos de experimentación y de control o referencia (o ambos)
- comparación de la cantidad de sustancia, metabolitos o ambos, excretada por vía renal en los grupos de prueba y de referencia
- determinación de la zona bajo la curva, concentración plasmática/tiempo de la sustancia analizada, sus metabolitos o ambos, y comparación con datos de un grupo de referencia

⁽¹⁾ En este método, se entiende por grupo de referencia aquél al que se administra la sustancia analizada por otra vía que garantiza una disponibilidad completa de la dosis.

Distribución

Existen actualmente dos métodos, de los que uno o ambos pueden utilizarse para analizar los patrones de distribución:

- se obtiene información cualitativa útil, mediante técnicas autorradiográficas del cuerpo entero
- se obtiene información cuantitativa, por sacrificio de los animales en momentos diferentes tras la exposición para determinar la concentración y la cantidad de la sustancia estudiada, sus metabolitos o ambos en tejidos y órganos.

Excreción

En los estudios de excreción, se recogen orina, heces y aire espirado, y en determinadas circunstancias bilis. La cantidad de la sustancia estudiada, sus metabolitos o ambos en estas excretas se determinarán, en varios momentos tras la exposición, hasta que se haya excretado alrededor del 95 % de la dosis administrada o durante siete días, si tal porcentaje no se alcanza antes.

En casos especiales, tal vez deba tenerse en cuenta la excreción de la sustancia en la leche de animales lactantes de experimentación.

Metabolismo

Para determinar el modo y la intensidad del metabolismo, se analizarán muestras biológicas por técnicas apropiadas. Se estudiarán las estructuras de los metabolitos y se propondrán vías metabólicas apropiadas cuando haya necesidad de responder a interrogantes planteados por estudios toxicológicos previos. Quizá sea útil realizar estudios *in vitro* para obtener información sobre las vías metabólicas.

Es posible obtener información complementaria sobre la relación del metabolismo con la toxicidad mediante estudios bioquímicos, como la determinación de los efectos sobre sistemas enzimáticos metabolizantes, la depleción de compuestos endógenos con grupos sulfhidrilos no proteicos y la unión de la sustancia a macromoléculas.

2. RESULTADOS

Según el tipo de estudio realizado, se resumirán los resultados en forma de tablas, complementadas por gráficos cuando proceda. Se mostrarán para cada grupo, cuando convenga, las variaciones medias y estadísticas de las determinaciones en relación con el tiempo, la posología, los tejidos y los órganos. Se establecerán, por métodos apropiados, el grado de absorción y la cantidad e índices de excreción. Cuando se realicen estudios de metabolismo, se indicará la estructura de los metabolitos identificados, y se presentarán las vías metabólicas posibles.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- caracterización de los materiales marcados, cuando se utilicen
- niveles posológicos e intervalos utilizados
- vía o vías de administración y vehículos utilizados
- efectos tóxicos y de otro tipo observados
- métodos de determinación de la sustancia objeto de ensayo, sus metabolitos o ambos en muestras biológicas, incluido el aire espirado
- presentación en tablas de las determinaciones en función de sexo, dosis, régimen, tiempo, tejidos y órganos

- indicación del grado de absorción y excreción con el tiempo
- métodos de caracterización e identificación de los metabolitos en muestras biológicas
- métodos de las determinaciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo
- vías de metabolismo propuestas
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B.37. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRACIÓN ÚNICA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

En la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, es importante considerar el potencial de ciertas clases de sustancias para causar tipos específicos de neurotoxicidad que pueden no detectarse con otros estudios de toxicidad. Se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada, por lo que debe considerarse su evaluación.

Pueden emplearse ensayos de cribado in vitro para detectar las sustancias capaces de producir polineuropatía retardada; sin embargo, unos resultados negativos en los estudios in vitro no excluyen que la sustancia estudiada sea neurotóxica.

Véase la introducción general de la Parte B.

1.2. Definiciones

Sustancias organofosforadas: ésteres organofosforados sin carga, tioésteres o anhídridos de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos u organofosforamídicos, o de ácidos fosfortioicos, fosfontioicos o fosfortioamídicos afines, u otras sustancias que puedan producir la neurotoxicidad retardada que a veces se aprecia en esta clase de sustancias.

Neurotoxicidad retardada: síndrome asociado con la aparición retardada y prolongada de ataxia, axonopatías distales en la médula espinal y en los nervios periféricos, e inhibición y envejecimiento de la esterasa diana de la neuropatía (NTE) en el tejido nervioso.

1.3. Sustancias de referencia

Puede someterse a ensayo una sustancia de referencia con un lote de control positivo como medio para demostrar que, en las condiciones de ensayo del laboratorio, no cambia significativamente la respuesta de las especies utilizadas.

Como ejemplo de neurotóxico de amplia utilización está el fosfato de tri-*o*-tolilo [n° CAS 78-30-8, n° EINECS 201-103-5, denominación CAS: tris(2-metilfenil) éster del ácido fosfórico], conocido también como tri-*o*-cresilfosfato.

1.4. Principio del método

Se da una sola dosis oral de la sustancia estudiada a gallinas domésticas, protegidas de los efectos colinérgicos agudos, cuando convenga. Se observa durante 21 días la aparición en los animales de anomalías de comportamiento, ataxia y parálisis. Se realizan medidas bioquímicas, especialmente la inhibición de la esterasa diana de la neuropatía (NTE), en gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada lote, normalmente a las 24 y 48 horas de la administración. A los 21 días de la exposición, se sacrifican las gallinas restantes y se procede al examen histopatológico de tejidos nerviosos seleccionados.

1.5. Descripción del método

1.5.1. Preparación

Se seleccionan al azar gallinas jóvenes sanas, libres de enfermedades víricas que puedan interferir y sin tratamiento médico, que no presenten anomalías de la marcha, se asignan a los lotes de tratamiento y de control y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 5 días antes del inicio del estudio.

Deben utilizarse jaulas o recintos de la capacidad suficiente para permitir la libre movilidad de las gallinas y la fácil observación de su marcha.

La sustancia estudiada se administrará normalmente por vía oral, utilizando sondas gástricas, cápsulas de gelatina o un método similar. Los líquidos pueden administrarse sin diluir o disueltos en un vehículo apropiado, como el aceite de maíz; los sólidos deben disolverse siempre que sea posible, ya que las grandes dosis de productos sólidos en cápsulas de gelatina pueden no absorberse de forma eficaz. Respecto a los vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas; en caso de no conocerse, se determinarán antes de la prueba.

1.5.2. Condiciones del ensayo

1.5.2.1. Animales de experimentación

Se recomienda la gallina ponedora doméstica adulta (*Gallus gallus domesticus*), de una edad comprendida entre 8 y 12 meses. Deben emplearse razas y variedades de tamaño normal y las gallinas se habrán criado normalmente en condiciones que permitan su movilidad libre.

1.5.2.2. Número y sexo

Además del lote de tratamiento, se utilizarán tanto un lote de control del vehículo como un lote de control positivo. El lote de control del vehículo debe tratarse de la misma forma que el lote de tratamiento, salvo que se omitirá la administración de la sustancia estudiada.

En cada lote de aves debe utilizarse un número suficiente de gallinas de forma que puedan matarse al menos 6 aves para hacer las determinaciones bioquímicas (tres en cada uno de los dos momentos seleccionados) y otras seis puedan sobrevivir durante el período de 21 días de observación de las patologías.

El lote de control positivo puede estudiarse a la vez o bien ser un lote de control estudiado recientemente. Debe incluir al menos seis gallinas, tratadas con un neurotóxico conocido de efecto retardado, de las que tres se destinarán a las pruebas bioquímicas y otras tres a la observación de la patología. Se recomienda la actualización periódica de los datos de los antecedentes. Deben obtenerse nuevos datos de lotes de control positivo cuando el laboratorio que realice las pruebas haya cambiado algún elemento fundamental de éstas (por ejemplo, raza, alimentación, condiciones de alojamiento).

1.5.2.3. Dosis

Debe realizarse un estudio preliminar con un número adecuado de gallinas y lotes de distintas dosis, a fin de determinar la dosis que debe utilizarse en el estudio principal. En el estudio preliminar es necesario que se produzca letalidad, a fin de definir una dosis adecuada para el estudio principal. No obstante, para evitar la muerte debida a los efectos colinérgicos agudos, puede utilizarse atropina u otro agente protector que no interfiera con las respuestas neurotóxicas retardadas. Pueden utilizarse diversos métodos de ensayo para evaluar la dosis máxima no letal de las sustancias estudiadas (véase el método B.1 bis). También puede ayudar a seleccionar la dosis la consideración de datos de antecedentes de las gallinas u otra información toxicológica. La dosis de la sustancia en el estudio principal debe ser lo más elevada posible, teniendo en cuenta los resultados del estudio preliminar de selección de la dosis y el límite superior a 2 000 mg/kg de peso corporal. La mortalidad que pueda darse no debe interferir con la supervivencia de animales suficientes para las pruebas bioquímicas (seis) e histológicas (seis) hasta el día 21. Debe utilizarse atropina u otro agente protector que no interfiera con las respuestas neurotóxicas retardadas, para evitar la muerte por efectos colinérgicos agudos.

1.5.2.4. Ensayo límite

Si un ensayo con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo los procedimientos descritos para el presente estudio, no produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de los datos procedentes de sustancias relacionadas estructuralmente, no cabe esperar la aparición de fenómenos tóxicos, puede considerarse innecesario un estudio con una dosis superior. El ensayo límite es aplicable excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5.2.5. Período de observación

El período de observación debe ser de 21 días.

1.5.3. Procedimiento

Tras administrar un protector para evitar la muerte por efectos colinérgicos agudos, se administra una sola dosis de la sustancia estudiada.

1.5.3.1. Observación general

La observación debe iniciarse inmediatamente tras la administración. Todas las gallinas deben observarse cuidadosamente varias veces durante los 2 primeros días y posteriormente al menos una vez al día durante un período de 21 días o hasta el sacrificio programado. Deben registrarse todos los signos de toxicidad, con inclusión del momento de aparición, tipo, gravedad y duración

de las anomalías de comportamiento. La ataxia debe medirse con una escala de clasificación ordinal consistente en un mínimo de cuatro niveles, y debe registrarse la eventual parálisis. Al menos dos veces por semana deben sacarse de las jaulas las gallinas seleccionadas para la observación de las patologías y someterse a un período de actividad motriz forzada (como subida de una escalera) a fin de facilitar la observación de efectos tóxicos mínimos. Los animales moribundos o que presenten dolor o sufrimiento intenso deben sacarse en cuanto se observen, sacrificarse de forma compasiva y someterse a autopsia.

1.5.3.2. Peso corporal

Deben pesarse todas las gallinas justo antes de la administración de la sustancia estudiada y al menos una vez por semana posteriormente.

1.5.3.3. Bioquímica

En el plazo de unos días después de la administración, deben sacrificarse seis gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los lotes de tratamiento y de control del vehículo, y tres del lote de control positivo (cuando este lote se utilice en paralelo). El cerebro y la médula lumbar se prepararán y estudiarán para detectar la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Además, también puede ser útil preparar y estudiar tejido del nervio ciático para medir la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Normalmente, se sacrificarán tres aves del lote de control y de cada lote de tratamiento a las 24 horas, y otras tres a las 48 horas, mientras que las tres gallinas de los controles positivos se sacrificarán a las 24 horas. Si la observación de signos clínicos de intoxicación (ésta puede evaluarse frecuentemente observando el momento de aparición de signos colinérgicos) indica que el agente tóxico se elimina muy despacio, podrá ser preferible tomar dos veces tejidos de tres aves entre las 24 y las 72 horas a partir de la administración.

También pueden hacerse análisis de la acetilcolinesterasa (ACE) con estas muestras, si se considera conveniente. No obstante, puede darse in vivo una reactivación espontánea de la ACE, llevando así a una subestimación de la potencia de la sustancia como inhibidora de la ACE.

1.5.3.4. Autopsia macroscópica

La autopsia macroscópica de todos los animales (sacrificados de forma programada y sacrificados por encontrarse moribundos) debe incluir la observación del aspecto del cerebro y de la médula espinal.

1.5.3.5. Examen histopatológico

Se someterán a examen microscópico muestras de tejido nervioso de los animales supervivientes al final del período de observación que no se hayan utilizado en los estudios bioquímicos. Los tejidos se fijarán in situ, utilizando técnicas de perfusión. Las secciones serán del cerebelo (nivel medio longitudinal), bulbo raquídeo, médula espinal y nervios periféricos. Las secciones de la médula espinal deben tomarse del segmento cervical superior y de las regiones media-dorsal y lumbo-sacra. Deben tomarse también secciones de la región distal del nervio tibial y sus ramificaciones al músculo gastrocnemio y del nervio ciático. Las secciones se someterán a tinción con colorantes adecuados específicos de la mielina y del axón.

2. RESULTADOS

La obtención de resultados negativos respecto a los parámetros seleccionados en este método (bioquímica, histopatología y observación del comportamiento) no requiere normalmente la realización de más ensayos de neurotoxicidad retardada. La obtención de resultados dudosos o ambiguos respecto a estos parámetros sí puede hacer necesaria otra evaluación.

Deben proporcionarse datos individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma tabular, indicando para cada lote de ensayo el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales que presenten lesiones o efectos bioquímicos o de comportamiento, los tipos y gravedad de estas alteraciones, y el porcentaje de animales que presenten cada tipo y grado de alteración.

Las observaciones del presente estudio deben evaluarse en términos de incidencia, gravedad y correlación de los efectos bioquímicos, histopatológicos y de comportamiento, así como

cualquier otro efecto observado en los lotes tratados y de control.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante métodos estadísticos adecuados de aceptación general. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3. INFORME

Informe del ensayo

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

Animales de ensayo:

- variedad utilizada
- número y edad de los animales
- origen, condiciones de alojamiento, etc.
- peso de cada animal al inicio de la prueba.

Condiciones del ensayo:

- datos sobre la preparación, estabilidad y homogeneidad de la sustancia estudiada, cuando convenga
- justificación de la elección del vehículo
- datos sobre la administración de la sustancia estudiada
- datos sobre la calidad de los alimentos y del agua
- justificación de la selección de la dosis
- especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado
- identidad y datos de la administración de cualquier protector.

Resultados:

- datos sobre el peso corporal
- datos de la respuesta tóxica por lotes, incluida la mortalidad
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (tanto si son reversibles como si no)
- descripción detallada de los métodos y observaciones bioquímicas
- observaciones de la autopsia
- descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. REFERENCIAS

El presente método es análogo a la TG 418 de la OCDE.

B.38. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS. ESTUDIO POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA DE 28 DÍAS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

En la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, es importante considerar el potencial de ciertas clases de sustancias para causar tipos específicos de neurotoxicidad que pueden no detectarse con otros estudios de toxicidad. Se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada, por lo que debe considerarse su evaluación.

Pueden emplearse ensayos de cribado in vitro para detectar las sustancias capaces de producir polineuropatía retardada; sin embargo, unos resultados negativos en los estudios in vitro no excluyen que la sustancia estudiada sea neurotóxica.

Este ensayo de 28 días de neurotoxicidad retardada proporciona información sobre los riesgos sanitarios que puede provocar una exposición repetida a lo largo de un período limitado de tiempo. Da información sobre la respuesta a las dosis y proporciona una estimación del nivel sin efectos adversos observados que puede ser útil para establecer criterios de seguridad de la exposición.

Véase la introducción general de la Parte B.

1.2. Definiciones

Sustancias organofosforadas: ésteres organofosforados sin carga, tioésteres o anhídridos de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos u organofosforamídicos, o de ácidos fosforotioicos, fosfonotioicos o fosforotioamídicos afines, u otras sustancias que puedan producir la neurotoxicidad retardada que a veces se aprecia en esta clase de sustancias.

Neurotoxicidad retardada: síndrome asociado con la aparición retardada y prolongada de ataxia, axonopatías distales en la médula espinal y en los nervios periféricos, e inhibición y envejecimiento de la esterasa diana de la neuropatía (NTE) en el tejido nervioso.

1.3. Principio del método

Se dan dosis orales diarias de la sustancia estudiada a gallinas domésticas durante 28 días. Se observa al menos diariamente la aparición en los animales de anomalías de comportamiento, ataxia y parálisis, hasta que pasen 14 días desde la última administración. Se realizan medidas bioquímicas, especialmente la inhibición de la esterasa diana de la neuropatía (NTE), en gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada lote, normalmente a las 24 y 48 horas de la última administración. A las dos semanas de la última dosis, se sacrifican las gallinas restantes y se procede al examen histopatológico de tejidos nerviosos seleccionados.

1.4. Descripción del método

1.4.1. Preparación

Se seleccionan al azar gallinas jóvenes sanas, libres de enfermedades víricas que puedan interferir y sin tratamiento médico, que no presenten anomalías de la marcha, se asignan a los lotes de tratamiento y de control y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 5 días antes del inicio del estudio.

Deben utilizarse jaulas o recintos de la capacidad suficiente para permitir la libre movilidad de las gallinas y la fácil observación de su marcha.

La sustancia estudiada se administrará todos y cada uno de los días por vía oral, de preferencia utilizando sondas gástricas o cápsulas de gelatina. Los líquidos pueden administrarse sin diluir o disueltos en un vehículo apropiado, como el aceite de maíz; los sólidos deben disolverse siempre que sea posible, ya que las grandes dosis de productos sólidos en cápsulas de gelatina pueden no absorberse de forma eficaz. Respecto a los vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas; en caso de no conocerse, se determinarán antes de la prueba.

1.4.2. Condiciones del ensayo

1.4.2.1. Animales de experimentación

Se recomienda la gallina ponedora doméstica adulta (*Gallus gallus domesticus*), de una edad

comprendida entre 8 y 12 meses. Deben emplearse razas y variedades de tamaño normal y las gallinas se habrán criado normalmente en condiciones que permitan su movilidad libre.

1.4.2.2. Número y sexo

Se utilizarán generalmente al menos tres lotes de tratamiento y un lote de control del vehículo. El lote de control del vehículo debe tratarse de la misma forma que el lote de tratamiento, salvo que se omitirá la administración de la sustancia estudiada.

En cada lote de aves debe utilizarse un número suficiente de gallinas de forma que puedan matarse al menos 6 aves para hacer las determinaciones bioquímicas (tres en cada uno de los dos momentos seleccionados) y otras seis puedan sobrevivir durante el período de 14 días tras la exposición destinado a la observación.

1.4.2.3. Dosis

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta los resultados de un ensayo de neurotoxicidad aguda retardada y cualesquiera otros datos existentes sobre toxicidad o cinética del compuesto estudiado. La dosis superior debe elegirse con el fin de inducir efectos tóxicos, de preferencia neurotoxicidad retardada, pero sin producir la muerte ni sufrimiento patente. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados con la dosis inferior.

1.4.2.4. Ensayo límite

Si un ensayo con una dosis de al menos 1000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo los procedimientos descritos para el presente estudio, no produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de los datos procedentes de sustancias relacionadas estructuralmente, no cabe esperar la aparición de fenómenos tóxicos, puede considerarse innecesario un estudio con una dosis superior. El ensayo límite es aplicable excepto cuando la exposición humana prevista indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.4.2.5. Período de observación

Todos los animales se observarán al menos una vez al día durante el período de exposición y durante 14 días después, salvo en los casos de autopsia prevista.

1.4.3. Procedimiento

Los animales reciben la sustancia estudiada todos y cada uno de los días durante un período de 28 días.

1.4.3.1. Observación general

La observación debe iniciarse inmediatamente tras el inicio del tratamiento. Todas las gallinas deben observarse cuidadosamente al menos una vez al día durante cada uno de los 28 días del tratamiento y durante 14 días tras la última administración o hasta el sacrificio programado. Deben registrarse todos los signos de toxicidad, con inclusión del momento de aparición, tipo, gravedad y duración. Las observaciones incluirán las anomalías del comportamiento, sin limitarse a ellas. La ataxia debe medirse con una escala de clasificación ordinal consistente en un mínimo de cuatro niveles, y debe registrarse la eventual parálisis. Al menos dos veces por semana deben sacarse de las jaulas las gallinas y someterse a un período de actividad motriz forzada (como subida de una escalera) a fin de facilitar la observación de efectos tóxicos mínimos. Los animales moribundos o que presenten dolor o sufrimiento intenso deben sacarse en cuanto se observen, sacrificarse de forma compasiva y someterse a autopsia.

1.4.3.2. Peso corporal

Deben pesarse todas las gallinas justo antes de la primera administración de la sustancia estudiada y al menos una vez por semana posteriormente.

1.4.3.3. Bioquímica

En el plazo de unos días después de la última administración, deben sacrificarse seis gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los lotes de tratamiento y de control del vehículo. El cerebro y la médula lumbar se prepararán y estudiarán para detectar la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Además, también puede ser útil preparar y estudiar tejido del nervio ciático para medir la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía.

Normalmente, se sacrificarán tres aves del lote de control y de cada lote de tratamiento a las 24

horas, y otras tres a las 48 horas de la última administración. Si de datos procedentes del estudio de toxicidad aguda o de otros estudios (por ejemplo, de toxicocinética), se deduce que es preferible utilizar otros tiempos de sacrificio tras la última administración, entonces deberán aplicarse estos tiempos aportando la justificación pertinente.

También pueden hacerse análisis de la acetilcolinesterasa (ACE) con estas muestras, si se considera conveniente. No obstante, puede darse in vivo una reactivación espontánea de la ACE, llevando así a una subestimación de la potencia de la sustancia como inhibidora de la ACE.

1.4.3.4. Autopsia macroscópica

La autopsia macroscópica de todos los animales (sacrificados de forma programada y sacrificados por encontrarse moribundos) debe incluir la observación del aspecto del cerebro y de la médula espinal.

1.4.3.5. Examen histopatológico

Se someterán a examen microscópico muestras de tejido nervioso de los animales supervivientes al final del período de observación que no se hayan utilizado en los estudios bioquímicos. Los tejidos se fijarán in situ, utilizando técnicas de perfusión. Las secciones serán del cerebelo (nivel medio longitudinal), bulbo raquídeo, médula espinal y nervios periféricos. Las secciones de la médula espinal deben tomarse del segmento cervical superior y de las regiones media-dorsal y lumbo-sacra. Deben tomarse también secciones de la región distal del nervio tibial y sus ramificaciones al músculo gastrocnemio y del nervio ciático. Las secciones se someterán a tinción con colorantes adecuados específicos de la mielina y del axón. En principio, debe hacerse el examen microscópico de los tejidos conservados de todos los animales de los lotes de control y de dosis alta. Cuando haya pruebas de efectos en el lote de dosis alta, deberá hacerse también el examen microscópico de las gallinas de los lotes de dosis intermedia y baja.

2. RESULTADOS

La obtención de resultados negativos respecto a los parámetros seleccionados en este método (bioquímica, histopatología y observación del comportamiento) no requiere normalmente la realización de más ensayos de neurotoxicidad retardada. La obtención de resultados dudosos o ambiguos respecto a estos parámetros sí puede hacer necesaria otra evaluación.

Deben proporcionarse datos individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma tabular, indicando para cada lote de ensayo el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales que presenten lesiones o efectos bioquímicos o de comportamiento, los tipos y gravedad de estas alteraciones, y el porcentaje de animales que presenten cada tipo y grado de alteración.

Las observaciones del presente estudio deben evaluarse en términos de incidencia, gravedad y correlación de los efectos bioquímicos, histopatológicos y de comportamiento, así como cualquier otro efecto observado en los lotes tratados y de control.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante métodos estadísticos adecuados de aceptación general. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3. INFORME

Informe del ensayo

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

Animales de ensayo:

- variedad utilizada
- número y edad de los animales
- origen, condiciones de alojamiento, etc.
- peso de cada animal al inicio de la prueba.

Condiciones del ensayo:

- datos sobre la preparación, estabilidad y homogeneidad de la sustancia estudiada, cuando convenga
- justificación de la elección del vehículo
- datos sobre la administración de la sustancia estudiada

- datos sobre la calidad de los alimentos y del agua
- justificación de la selección de la dosis
- especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado
- justificación de la elección de los tiempos para las determinaciones bioquímicas, en caso de que no sean 24 y 48 horas.

Resultados:

- datos sobre el peso corporal
- datos de la respuesta tóxica por lotes, incluida la mortalidad
- nivel sin efectos adversos observados
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (tanto si son reversibles como si no)
- descripción detallada de los métodos y observaciones bioquímicas
- observaciones de la autopsia
- descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados

Conclusiones

4. REFERENCIAS

El presente método es análogo a la TG 419 de la OCDE.

B.39. ENSAYO DE SÍNTESIS DE ADN NO PROGRAMADA (UDS)

EN HEPATOCITOS DE MAMÍFERO *IN VIVO*

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 486 sobre el ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero *in vivo* (1997).

1.1 INTRODUCCIÓN

El ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero *in vivo* tiene por objeto determinar sustancias de ensayo que inducen la reparación del ADN en los hepatocitos de animales tratados (1)(2)(3)(4).

El presente ensayo *in vivo* constituye un método de investigación de los efectos genotóxicos de los productos químicos en el hígado y sirve para detectar lesiones en el ADN y su posterior reparación en las células hepáticas. El hígado suele ser el lugar donde más se metabolizan los compuestos absorbidos y por ello constituye el órgano más apropiado para la detección de lesiones del ADN *in vivo*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo no llega al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

La síntesis de ADN no programada (UDS) se determina midiendo la incorporación de nucleósidos marcados en células que no se encuentran en la fase S de síntesis programada de ADN. La técnica más empleada consiste en determinar la captación de timidina tritiada (^3H -TdR) por autorradiografía. Para los ensayos de UDS *in vivo* es preferible utilizar hígados de rata. También pueden emplearse otros tejidos, si bien no se tratan en las presentes directrices.

La detección de una respuesta de UDS depende del número de bases del ADN eliminadas y repuestas en el sitio de la lesión. De ahí que el ensayo de UDS sea particularmente útil para detectar la reparación de secuencias largas (20 a 30 bases; secuencias largas de reparación) inducida por una sustancia. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo para detectar la reparación de secuencias cortas (1 a 3 bases; secuencias cortas de reparación) es mucho menor. Por otra parte, las alteraciones mutagénicas pueden deberse a una falta de reparación o a una reparación o replicación erróneas de las lesiones del ADN. La magnitud de la respuesta de UDS no es indicativa de la fidelidad del proceso de reparación. Además de ello, es posible que un mutágeno reaccione con el ADN, pero que la lesión de éste no se repare por un mecanismo de reparación de excisión. La falta de información específica sobre la actividad mutagénica que caracteriza al ensayo UDS se ve compensada por su sensibilidad potencial, ya que detecta los efectos en todo el genoma.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2 DEFINICIONES

Células en reparación: células con un número neto de granulaciones nucleares (NGN) superior a un número preestablecido que el laboratorio donde se realiza el ensayo ha de fundamentar.

Número neto de granulaciones nucleares (NGN): medida cuantitativa de la síntesis de ADN no programada en las células por autorradiografía; se calcula restando el número medio de granulaciones citoplasmáticas (GC) en las zonas citoplasmáticas equivalentes al núcleo del número de granulaciones nucleares (GN): $\text{NGN} = \text{GN} - \text{GC}$. Primero se calcula el NGN de cada célula y después el correspondiente a todo un cultivo o a cultivos paralelos, etc.

Síntesis de ADN no programada (UDS): síntesis de reparación de ADN tras la excisión y eliminación de un segmento de ADN que contiene una región dañada por sustancias químicas o agentes físicos.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* detecta la síntesis de reparación del ADN tras la excisión y eliminación de un segmento de ADN que contiene una región dañada por sustancias químicas o agentes físicos. El ensayo suele fundarse en la incorporación de ³H-TdR al ADN de hepatocitos de los cuales una escasa proporción se encuentra en la fase S del ciclo celular. La incorporación de ³H-TdR suele determinarse por autorradiografía, ya que esta técnica no es tan sensible a las interferencias debidas a las células en fase S como lo es, por ejemplo, el recuento por centelleo de líquidos.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 **Preparación**

1.4.1.1 *Selección de la especie animal*

Si bien suelen emplearse ratas, pueden utilizarse otras especies de mamíferos apropiadas. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2 *Alojamiento y alimentación de los animales*

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60 %.

1.4.1.3 *Preparación de los animales*

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

1.4.1.4 *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2 **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1 *Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2 *Controles*

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en cada parte independiente del experimento. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos se emplearán sustancias de las que se sepa que inducen la síntesis de ADN no programada cuando se administran en dosis con las que se prevé un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Los controles positivos que requieran activación metabólica se realizarán con dosis que provoquen una respuesta moderada (4). Las dosis del control positivo pueden ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Periodo de muestreo	Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Corto (2 a 4 horas)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Largo (12 a 16 horas)	N-2-fluorenilacetamida (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. La sustancia del control positivo puede administrarse por una vía distinta de la de la sustancia de ensayo.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 **Número y sexo de los animales**

El número de animales deberá decidirse tomando en consideración la variación biológica natural de la respuesta al ensayo. Cada lote estará constituido al menos por tres animales analizables. Si se dispone de una base de datos de controles históricos importante, bastarán uno o dos animales para los lotes de los controles negativos y positivos realizados en paralelo.

Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo, preferiblemente en machos. En caso de que la exposición humana a sustancias químicas pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2 **Pauta de tratamiento**

Las sustancias de ensayo suelen administrarse en una sola vez.

1.5.3 **Dosis**

En principio, se administran al menos dos dosis distintas. Se entiende por dosis máxima la que produce tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo resultaría probablemente letal. Por lo general, la dosis inferior es del 50 % al 25 % de la dosis máxima.

Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal.

La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad hepática (por ejemplo, núcleos picnóticos).

1.5.4 **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5 **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. La vía intraperitoneal no está indicada, ya que podría exponer el hígado a la sustancia de ensayo directamente en lugar de a través del sistema circulatorio. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a éste. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6 **Preparación de los hepatocitos**

Se extraen hepatocitos de los animales tratados, por lo general de 12 a 16 horas después de la administración de la sustancia de ensayo. Suele ser necesaria otra toma previa (generalmente de 2 a 4 horas después del tratamiento), salvo que a las 12-16 horas haya una respuesta positiva clara. No obstante, pueden aplicarse otros periodos de muestreo, si así lo justifican los datos toxicocinéticos.

Los cultivos de hepatocitos de mamífero a corto plazo se realizan perfundiendo el hígado *in situ* con colagenasa y dejando que los hepatocitos recién disociados se adhieran a una superficie adecuada. La viabilidad de los hepatocitos de los animales del control negativo ha de ser del 50 % como mínimo (5).

1.5.7 **Determinación de la síntesis de ADN no programada**

Los hepatocitos de mamífero recién aislados se incuban en un medio con ³H-TdR durante un tiempo adecuado, por ejemplo, de 3 a 8 horas. Al término de la incubación, se retiran las células del medio y pueden entonces incubarse en otro medio con un exceso de timidina sin tratar con el fin de reducir la radiactividad no incorporada ("cold chase"). A continuación, se aclaran las células, se fijan y se tiñen. Esta segunda incubación puede no ser necesaria si la primera ha sido más larga. Se bañan los portaobjetos en una emulsión autorradiográfica, se exponen en la oscuridad (por ejemplo, refrigerados, de 7 a 14 días), se revelan y tiñen y se cuentan los granos de plata expuestos. Se preparan dos o tres portaobjetos por animal.

1.5.8 Análisis

Las preparaciones han de contener un número suficiente de células de morfología normal para que la evaluación de la síntesis de ADN no programada sea significativa. Se observan las preparaciones al microscopio en busca de signos de citotoxicidad manifiesta (por ejemplo, piconosis, índice reducido de marcado radiactivo, etc.).

Se codifican los portaobjetos antes del recuento de granulaciones. Por lo general, se cuentan 100 células por animal, en dos portaobjetos como mínimo. El recuento de menos de 100 células por animal deberá estar debidamente justificado. Si bien los núcleos en fase S no se consideran en el recuento de granulaciones, puede registrarse la proporción de células en fase S.

Se determinará con métodos apropiados la cantidad de $^3\text{H-TdR}$ incorporada en los núcleos y el citoplasma de las células con morfología normal, revelada por el depósito de granos de plata.

El recuento de granulaciones se hace en los núcleos (granulaciones nucleares, GN) y en las zonas citoplasmáticas equivalentes al núcleo (granulaciones citoplasmáticas, GC). Las GC se cuentan considerando la zona citoplasmática más radiactiva o tomando la media de dos o tres recuentos realizados al azar de granulaciones citoplasmáticas adyacentes al núcleo. Pueden aplicarse otros métodos de recuento, por ejemplo en la célula entera, si puede justificarse (6).

2. RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se proporcionarán los datos de cada portaobjetos y de cada animal. Se resumirán todos los datos en forma de tabla. Se calculará el número neto de granulaciones nucleares (NGN) por célula, por animal y por dosis y tiempo restando el número de GC del de GN. Si se cuentan las células en reparación, se motivará el criterio aplicado para definir las "células en reparación", que deberá fundarse en datos relativos a controles históricos negativos o realizados en paralelo al ensayo. Los resultados numéricos pueden evaluarse por medio de métodos estadísticos, que deberán seleccionarse y justificarse antes de llevar a cabo el estudio.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Entre los criterios para determinar si una respuesta es positiva o negativa se encuentran los siguientes:

respuesta positiva	i)	el NGN es superior a un valor preestablecido fundado en datos históricos obtenidos en el laboratorio;
o	ii)	el NGN supera de forma significativa al de los controles realizados en paralelo.
respuesta negativa	i)	el NGN no supera el umbral correspondiente a controles históricos;
o	ii)	el NGN no supera de forma significativa al de los controles realizados en paralelo.

Debe considerarse la importancia biológica de los resultados. Se tomarán en consideración, por ejemplo, la variabilidad entre animales, la relación dosis-respuesta y la citotoxicidad. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo. El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca lesiones del ADN en los hepatocitos de mamífero *in vivo* que pueden repararse por síntesis de ADN no programada *in vitro*. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca lesiones del ADN detectables mediante este ensayo.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo pase al torrente circulatorio o llegue específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo;
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas;
- número, edad y sexo de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.;
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

- controles positivos y negativos (vehículo o disolvente);
- datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo;
- fundamento de la selección de la dosis;
- preparación de la sustancia de ensayo;
- administración de la sustancia de ensayo;
- fundamento de la elección de la vía de administración;
- métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso;
- conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede;
- calidad de los alimentos y el agua;
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras;

- métodos de determinación de la toxicidad;
- métodos de preparación y cultivo de los hepatocitos;
- técnica autorradiográfica utilizada;
- número de portaobjetos preparados y de células sometidas a recuento;
- criterios de evaluación;
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- media de granulaciones nucleares, granulaciones citoplasmáticas y granulaciones nucleares netas por portaobjetos, animal y lote;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- evaluación estadística, si se ha realizado;
- signos de toxicidad;
- datos de los controles negativos (disolvente o vehículo) y positivos realizados en paralelo;
- datos de controles históricos negativos (disolvente o vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar;
- número de “células en reparación”, si se ha determinado;
- número de células en fase S, si se ha determinado;
- viabilidad de las células.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. y Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, 1-18.
2. Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. y Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. *Mutation Res.* 189, 123-133.
3. Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. y Mitchell, I. de G. (1993). *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. En: Kirkland D.J. and Fox M., (eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
4. Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. y Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, 263-285.
5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. y Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). *Mutation Res.*, 291, 21-27.
6. Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. y Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen.* 4, 553-562.

B.40. CORROSIÓN CUTÁNEA

1. MÉTODO

1.1 INTRODUCCIÓN

El Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (CEVMA, Centro Común de Investigación, Comisión Europea) ha considerado científicamente válidos dos ensayos *in vitro* de corrosividad cutánea: el ensayo de resistencia eléctrica transcutánea en piel de rata (the rat skin transcutaneous electrical resistance (TER)) y un ensayo que emplea un modelo de piel humana (1)(2)(3). El estudio de validación del CEVMA demostró que ambos ensayos podían discriminar de manera fiable entre agentes corrosivos y no corrosivos cutáneos conocidos. Además, el protocolo del ensayo basado en un modelo de piel humana permitió una distinción correcta entre grados de efectos corrosivos (agentes corrosivos potentes conocidos, R35, y otros agentes corrosivos cutáneos, R34) (2). A continuación, se dan las descripciones y procedimientos de ambos ensayos, cuya elección depende de las necesidades concretas y las preferencias del usuario.

Véase también la introducción general de la parte B.

1.2 DEFINICIONES

Corrosión cutánea: producción de daños tisulares irreversibles en la piel tras la aplicación de una sustancia de ensayo.

1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No se especifica ninguna pero véanse los apartados 1.5.3.4 y 1.7.2.3.

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO. ENSAYO TER EN PIEL DE RATA

La sustancia de ensayo se aplica durante 24 horas a las superficies epidérmicas de discos cutáneos tomados de la piel de ratas jóvenes sacrificadas sin causar sufrimientos. Las sustancias corrosivas se caracterizan por su capacidad de producir una pérdida de la integridad normal de la capa córnea y de la función de barrera. Esta pérdida se mide como reducción de la TER inherente por debajo de un umbral ($5k\Omega$) (4)(5). Las sustancias irritantes y no irritantes no reducen la TER por debajo del umbral. Para los surfactantes y las sustancias orgánicas neutras (véase la definición en la referencia (6)) puede incorporarse al procedimiento de ensayo un paso consistente en la fijación de un colorante con el fin de reducir el número de falsos positivos que se obtienen concretamente con estos tipos químicos (2) y (7).

1.5 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO. ENSAYO TER EN PIEL DE RATA

1.5.1 Animales

Para la preparación de los discos de piel se necesitan ratas jóvenes (20-23 días) (Wistar o una cepa comparable). El pelo dorsal y de los costados se rasura con cuidado utilizando una maquinilla para animales pequeños. A continuación se lavan los animales enjugándolos cuidadosamente al mismo tiempo que se sumerge la zona en una solución antibiótica (que contenga, por ejemplo, estreptomycin, penicilina, cloranfenicol y anfotericina en concentraciones que sean efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano). Al tercer o cuarto día después del primer lavado se lavan otra vez los animales con antibióticos y se usan dentro de los tres días siguientes (los animales no pueden tener más de 31 días de edad para la preparación de piel).

1.5.2 Preparación de los discos cutáneos

Se sacrifican los animales sin sufrimientos. A continuación se retira la piel dorsal de cada animal y se le quita la grasa separándola de la piel cuidadosamente. Se coloca la piel en el extremo de un tubo de PTFE (politetrafluoroetileno), comprobando que la superficie epidérmica esté en contacto con el mismo. Se coloca a presión un anillo de goma en el extremo del tubo para mantener la piel en su sitio y se recorta el tejido sobrante. En la figura 1 se dan las dimensiones del anillo y del tubo. Después se sella con cuidado el anillo de goma al extremo del tubo de PTFE con vaselina. El tubo se sujeta mediante una pinza de muelle dentro de una cámara receptora que contiene una solución de sulfato de magnesio (154mM) (Figura 2).

1.5.3 Procedimiento

1.5.3.1 Aplicación del material de ensayo

Dentro del tubo se aplican a la superficie epidérmica sustancias líquidas de ensayo (150 μ l) (figura 2). Cuando se prueban materias sólidas se aplica al disco una cantidad suficiente del sólido de tal manera que quede cubierta toda la superficie de epidermis. A continuación se vierte encima del sólido agua desionizada (150 μ l) y se agitan suavemente los tubos. Las sustancias de ensayo deben tener el máximo contacto posible con la piel. Para algunos sólidos este contacto máximo puede conseguirse calentando hasta 30° C para fundir la sustancia de ensayo o moliéndola para producir un polvo o un granulado.

Para cada sustancia de ensayo se utilizan tres discos cutáneos. La sustancia de ensayo se aplica durante 24 horas (véase también 1.5.3.4) y se elimina lavando bajo el chorro de agua del grifo a 30° C hasta que no pueda eliminarse más materia. La eliminación de sustancias de ensayo que se hayan solidificado en el tubo puede facilitarse mediante un lavado a chorro con agua caliente a aproximadamente 30° C.

1.5.3.2 Mediciones de la TER

La TER se mide mediante un puente de corriente alterna y baja tensión (por ejemplo, AIM 401 o 6401, o equivalente). Antes de medir la resistencia eléctrica, se reduce la tensión superficial de la piel añadiendo la cantidad suficiente de etanol al 70% para cubrir la epidermis. Después de unos segundos se quita el etanol dando la vuelta al tubo y entonces se hidrata el tejido aplicando 3ml de una solución de sulfato de magnesio (154mM). Los electrodos del puente se colocan a ambos lados del disco cutáneo para medir la resistencia en $k\Omega$ /disco (figura 2). En la figura 1 se dan las dimensiones de los electrodos y la longitud del electrodo expuesta por debajo de las pinzas de cocodrilo. La pinza que sujeta el electrodo interior (grueso) se coloca encima del tubo de PTFE durante la medición de la resistencia para asegurarse de que la longitud del electrodo que queda sumergida en la solución de sulfato de magnesio es constante. El electrodo exterior (delgado) se coloca dentro de la cámara receptora de manera que esté en contacto con el fondo de la misma. La distancia entre el fondo de la pinza de muelle y el fondo del tubo de PTFE se mantendrá constante (figura 1), ya que esta distancia afecta al valor de la resistencia obtenido.

Téngase en cuenta que si el valor de la resistencia medido es superior a 20 $k\Omega$, puede deberse a la sustancia de ensayo que recubre la superficie epidérmica del disco cutáneo. Puede intentarse la eliminación de este recubrimiento, por ejemplo, sellando el tubo de PTFE con el pulgar cubierto de un guante y agitándolo aproximadamente diez segundos; se tira la solución de sulfato de magnesio y se repite la medición de la resistencia con otra solución de sulfato de magnesio.

Los resultados medios de la TER se aceptan a condición de que los valores de control positivos y negativos en paralelo queden dentro de intervalos aceptables para el método. A continuación se dan las sustancias de control propuestas y sus intervalos de resistencia aceptables para la metodología y el instrumental:

Control	Sustancia	Intervalo de resistencia ($k\Omega$)
Positivo	10M Ácido clorhídrico (36%)	0,5 - 1,0
Negativo	Agua destilada	10 - 25

1.5.3.3 Procedimiento modificado para surfactantes y sustancias orgánicas neutras

Si los valores TER de las sustancias de ensayo que sean surfactantes o sustancias orgánicas neutras son inferiores o iguales a 5 $k\Omega$, puede hacerse en los tejidos una evaluación de la penetración del colorante. Este procedimiento determinará si los resultados son falsos positivos (2).

1.5.3.3.1 Aplicación y eliminación del colorante sulforodamina B

Después del tratamiento inicial con la sustancia de ensayo, se aplicarán 150µl de una dilución al 10% (p/v) de colorante sulforodamina B en agua destilada sobre la superficie epidérmica de cada disco cutáneo durante dos horas. A continuación, los discos se lavan a chorro con agua del grifo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 segundos para eliminar el colorante excedente o sin fijar. Cada disco cutáneo se retira cuidadosamente del tubo de PTFE y se coloca en un frasco (por ejemplo, un frasco de cristal de centelleo de 20ml) que contenga agua desionizada (8ml). Los frascos se agitan suavemente durante cinco minutos para eliminar el colorante excedente o sin fijar que haya quedado. Este procedimiento de aclarado se repite a continuación, después de lo cual se retiran los discos cutáneos y se colocan en frascos que contengan 5ml de dodecilsulfato sódico (SDS) al 30% (p/v) en agua destilada y se dejan incubar una noche a 60° C. Después de la incubación, se retira y desecha cada disco cutáneo y la solución restante se centrifuga 8 minutos a 21° C (fuerza centrífuga relativa ~175). Luego, se diluye 1 a 5 (v/v) [es decir, 1ml + 4ml] una muestra de 1ml del sobrenadante con dodecilsulfato sódico al 30% (p/v) en agua destilada. La densidad óptica (DO) de la solución se mide a aproximadamente 565nm.

1.5.3.3.2 Cálculo del contenido en colorante

El contenido en colorante sulforodamina B por disco se calcula a partir de los valores DO (coeficiente de extinción molar del colorante sulforodamina B a 565nm = $8,7 \times 10^4$; peso molecular = 580). El contenido en colorante sulforodamina B se determina para cada disco cutáneo y luego se calcula un contenido medio de colorante para los ensayos repetidos. Los resultados medios de fijación del colorante se aceptan a condición de que los valores de control en paralelo queden dentro de intervalos aceptables para el método. A continuación se dan los intervalos de contenido en colorante aceptables que se proponen para las sustancias de control y para la metodología y el instrumental:

Control	Sustancia	Intervalo del contenido en colorante (µg/disco)
Positivo	10M de ácido clorhídrico (36%)	40 - 100
Negativo	Agua destilada	15 - 35

1.5.3.4 Información complementaria

Pueden aplicarse también sustancias de ensayo a los discos cutáneos durante periodos más cortos (por ejemplo, 2 horas) para identificar aquellos materiales que sean fuertemente corrosivos. Sin embargo, en el estudio de validación, se halló que el ensayo TER sobrestimaba el potencial corrosivo de varias sustancias químicas de ensayo después de su aplicación a los discos cutáneos durante 2 horas (2), aunque permitía la correcta identificación de sustancias corrosivas y no corrosivas después de una aplicación de 24 horas.

Las propiedades y dimensiones del instrumental de ensayo y el procedimiento experimental utilizado pueden influir en los valores TER obtenidos. El umbral de corrosión de 5kΩ se determinó a partir de datos obtenidos con el instrumental y el procedimiento concretos descritos en este método. Si las condiciones de ensayo se modifican de manera significativa, pueden aplicarse diferentes umbrales y valores de control. Por tanto, se recomienda que la metodología y el umbral de resistencia se calibren probando una serie de sustancias de referencia elegidas entre los productos químicos utilizados en el estudio de validación (3).

1.6 PRINCIPIO DEL MÉTODO . ENSAYO CON MODELO DE PIEL HUMANA

El material de ensayo se aplica tópicamente durante 4 horas a un modelo tridimensional de piel humana que comprende una epidermis reconstruida con una capa córnea funcional. Los materiales corrosivos se caracterizan por su capacidad de producir una disminución de la viabilidad celular (determinada, por ejemplo, utilizando el ensayo de reducción del MTT) por debajo de determinados umbrales en periodos de exposición especificados. El principio del ensayo parte de la hipótesis de que los productos químicos corrosivos son los que pueden penetrar la capa córnea (por difusión o erosión) y son suficientemente citotóxicos para provocar la muerte de las células en las capas celulares subyacentes.

1.7 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO. ENSAYO CON MODELO DE PIEL HUMANA

1.7.1 Modelos de piel humana

Los modelos de piel humana pueden tener diferentes orígenes pero tienen que cumplir determinados criterios. El modelo debe tener una capa córnea funcional con una capa subyacente de células vivas. La función de barrera de la capa córnea debe ser adecuada, lo cual puede ponerse de manifiesto demostrando la resistencia del modelo a la citotoxicidad tras la aplicación de sustancias conocidas como citotóxicas pero que normalmente no atraviesan la capa córnea. Debe mostrarse que el modelo da resultados reproducibles en condiciones experimentales definidas.

La viabilidad de las células vivas del modelo debe ser suficientemente alta para discriminar bien entre las sustancias de controles positivos y negativos. La viabilidad celular (por ejemplo, medida por la reducción del MTT, es decir, un valor DO) tras la exposición a la sustancia del control negativo debe quedar dentro de límites aceptables para el modelo en cuestión. De la misma manera, los valores de viabilidad celular con la sustancia del control positivo (en relación con los del control negativo) deben quedar dentro de límites especificados y, lo que es más importante, hay que demostrar que el modelo de predicción utilizado cumple normas de validación internacionales.

1.7.2 Procedimiento

1.7.2.1 Aplicación de la sustancia de ensayo

Para materiales líquidos, debe aplicarse una cantidad de sustancia de ensayo suficiente para cubrir la superficie cutánea (un mínimo de 25µl/cm²). Para los materiales sólidos, tiene que aplicarse suficiente cantidad de sustancia para cubrir la piel y, a continuación, debe humedecerse para asegurar un buen contacto con la piel; cuando convenga, deberán molerse los sólidos para transformarlos en polvo antes de su aplicación. Debe mostrarse que el método de aplicación es adecuado para una amplia gama de tipos químicos (por ejemplo, véase la referencia 2). Al final del periodo de exposición, el material de ensayo debe lavarse cuidadosamente de la superficie de la piel con una solución salina.

1.7.2.2 Medición de la viabilidad celular

Para medir la viabilidad celular puede emplearse cualquier método cuantitativo validado. El ensayo utilizado más frecuentemente es la reducción del MTT, que se ha comprobado que da resultados exactos y reproducibles en diferentes laboratorios (2). El disco cutáneo se coloca en una solución de MTT de 0,3mg/ml a 20-28°C durante 3 horas. A continuación se extrae el formazano azul precipitado (extracción del disolvente) y se mide la concentración de formazano determinando la DO a una longitud de onda entre 545 y 595nm.

1.7.2.3 Información complementaria

El modelo de piel utilizado y el protocolo exacto del tiempo de exposición y los procedimientos de lavado, etc., tendrán un efecto importante en los resultados de la viabilidad celular. Se recomienda que la metodología y el modelo de predicción se calibren probando una serie de sustancias de referencia elegidas entre los productos químicos utilizados en el estudio de validación del CEVMA (3). Es crucial haber comprobado que el método utilizado es reproducible dentro y entre laboratorios para una amplia gama de productos químicos con arreglo a normas internacionales. Como mínimo, el método debe cumplir los criterios de validez científica definidos previamente (2) y los resultados de este estudio de validación deben publicarse en una revista científica que los someta a una revisión inter pares.

2. RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

2.1.1 Ensayo TER en piel de rata

Los valores de resistencia ($k\Omega$) para la sustancia de ensayo, los controles positivos y negativos y los posibles productos químicos de referencia deben darse en forma de tabla, incluyendo los datos de los experimentos repetidos, los valores medios y la clasificación derivada.

2.1.2 Ensayo con modelo de piel humana

Los valores DO y los datos sobre viabilidad celular calculados en porcentaje para la sustancia de ensayo, los controles positivos y negativos y los posibles productos químicos de referencia deben darse en forma de tabla, incluyendo los datos de los experimentos repetidos, los valores medios y la clasificación derivada.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

2.2.1 Ensayo TER sobre piel de rata

Si el valor medio TER obtenido para la sustancia de ensayo es superior a $5 k\Omega$, la sustancia no es corrosiva. Si el valor TER es inferior o igual a $5 k\Omega$, y la sustancia de ensayo no es un surfactante ni una sustancia orgánica neutra, la sustancia es corrosiva.

Para los surfactantes o sustancias orgánicas neutras que den valores TER inferiores o iguales a $5 k\Omega$, puede evaluarse la penetración de un colorante. Si el contenido medio de colorante en el disco es superior o igual al contenido medio de colorante en el disco del control positivo de HCl al 36% obtenido en paralelo, la sustancia de ensayo es un positivo verdadero y, por tanto, es corrosiva. Si el contenido medio de colorante en el disco es inferior al contenido medio de colorante en el disco del control positivo de HCl al 36% obtenido en paralelo, la sustancia de ensayo da un falso positivo y, por tanto, no es corrosiva.

2.2.2 Ensayo con modelo de piel humana

El valor DO del control negativo representa el 100% de viabilidad celular; de ahí que los valores DO obtenidos para cada muestra de ensayo puedan utilizarse para calcular un porcentaje de viabilidad respecto al control negativo. El porcentaje de viabilidad celular que permite distinguir entre sustancias de ensayo corrosivas y no corrosivas (o discriminar entre diferentes tipos de sustancias corrosivas) tiene que definirse claramente en el modelo de predicción antes de validar el método y el posterior estudio de validación debe demostrar que el valor que se utiliza para separar es adecuado (por ejemplo, véase la referencia 2).

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la siguiente información:

Sustancia de ensayo:

- datos de identificación, naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas; también debe darse información semejante para las sustancias de referencia, si se utilizan.

Condiciones del ensayo:

- particularidades del procedimiento de ensayo empleado
- descripción y justificación de posibles modificaciones.

Resultados:

- tabulación de los valores de resistencia (ensayo TER) o porcentajes de viabilidad celular (ensayo con modelo de piel humana) del material de ensayo, controles positivos y negativos y posibles productos químicos de referencia, incluyendo datos sobre experimentos repetidos y valores medios
- descripción de otros efectos observados.

Discusión de los resultados.

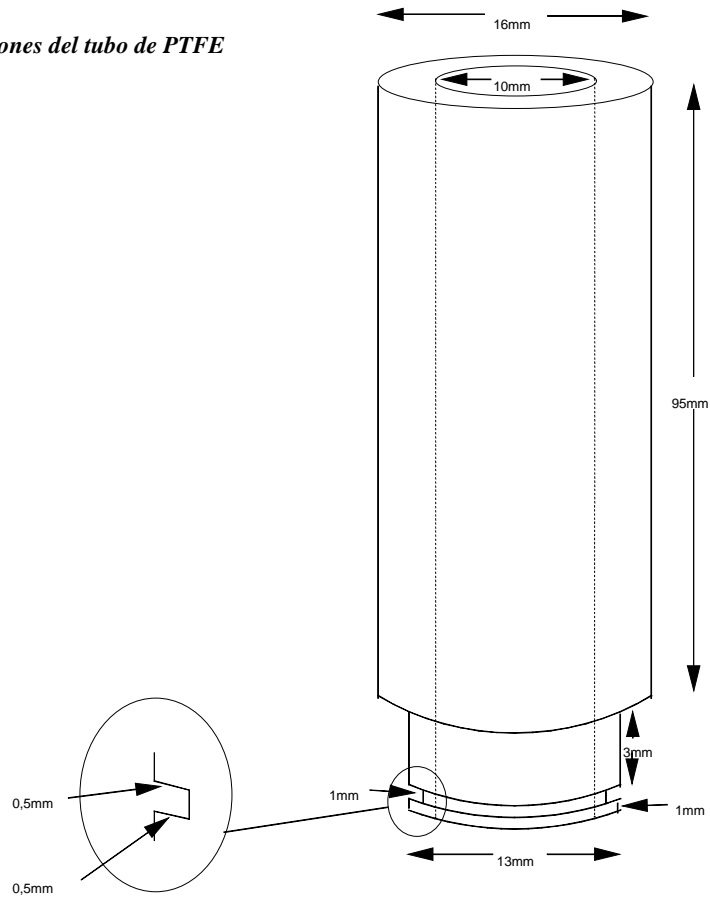
Conclusiones.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

1. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* **26**, 275-280.
2. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* **12**, 483-524.
3. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro* **12**, 471-482.
4. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test - modifications and validation. *Food & Chemical Toxicology* **24**, 507-512.
5. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. *Toxicology in Vitro* **6**, 191-194.
6. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998). An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA* **26**, 709-720.
7. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* **23**, 219-255.

Figura 1

Dimensiones del tubo de PTFE



Dimensiones de los electrodos

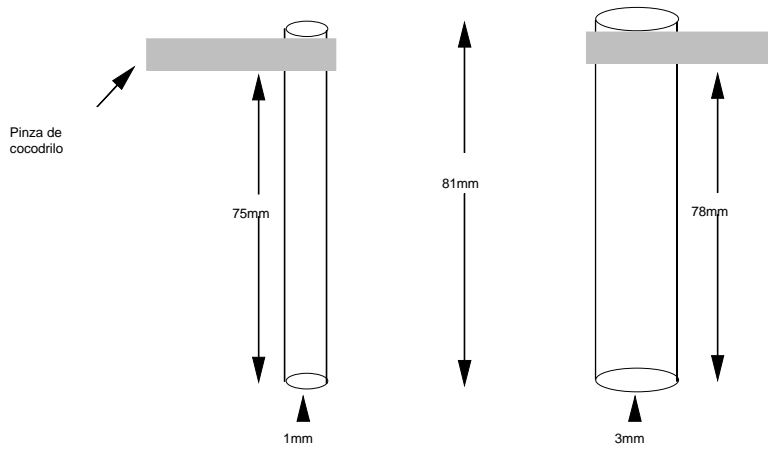
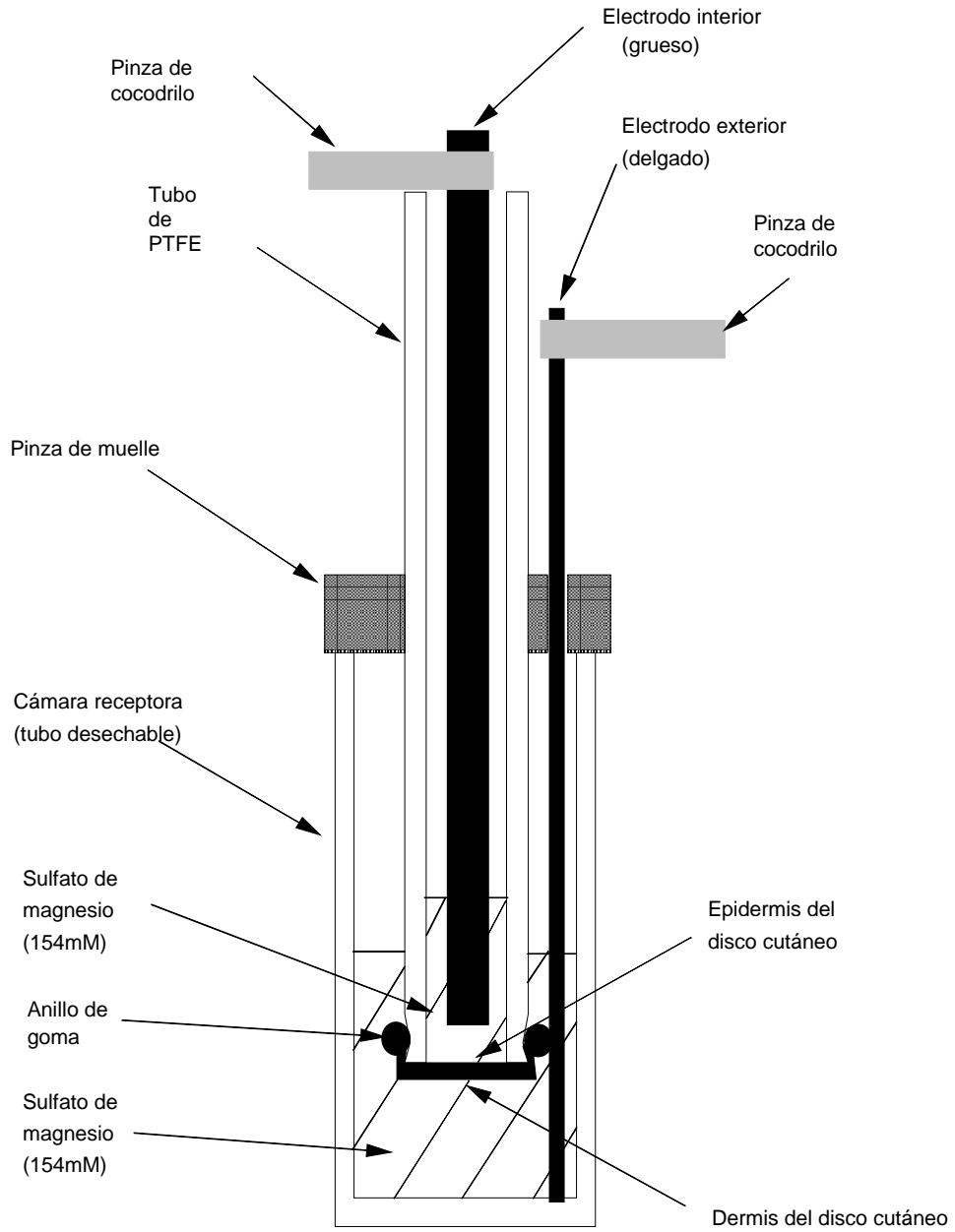


Figura 2

Instrumental para el ensayo TER en piel de rata



B. 41. FOTOTOXICIDAD - ENSAYO DE FOTOTOXICIDAD *IN VITRO* 3T3 NRU

1. MÉTODO

1.1 INTRODUCCIÓN

La fototoxicidad es una reacción tóxica que se produce tras la exposición de la piel a determinadas sustancias químicas y su posterior exposición a la luz, o por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia química.

La información que proporciona el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU sirve para determinar el potencial fototóxico de una sustancia de ensayo, es decir, para saber si puede entrañar peligros o no en caso de exposición a las radiaciones UV y de luz visible.

Dado que el parámetro toxicológico que se pone de manifiesto con el ensayo *in vitro* es la *fotocitotoxicidad*, provocada por la acción combinada de una sustancia y de la luz, el ensayo permite determinar compuestos que resultan fototóxicos *in vivo* tras su administración sistémica y difusión a la piel, así como compuestos que resultan fotoirritantes tras su aplicación tópica en la piel.

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU ha sido elaborado y validado en el marco de un proyecto conjunto UE/COLIPA entre 1992 y 1997 (1)(2)(3), con el fin de establecer un método *in vitro* válido para sustituir a los diversos ensayos *in vivo* empleados. En 1996 se recomendó en un taller de la OCDE un enfoque secuencial de ensayo *in vitro* para evaluar la fototoxicidad (4).

Los resultados del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU se han comparado con los efectos de fototoxicidad/fotoirritación aguda *in vivo* en animales y seres humanos, lo cual ha puesto de manifiesto que el ensayo proporciona una excelente predictividad de dichos efectos. El ensayo no está diseñado para detectar otros efectos adversos de la acción combinada de las sustancias químicas y la luz, como pueden ser la *fotogenotoxicidad*, la *fotoalergia* y la *fotocarcinogenicidad*, si bien muchas sustancias químicas que presentan esas propiedades darán un resultado positivo en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU. Además de ello, el ensayo tampoco permite evaluar la potencia *fototóxica*.

El Anexo I recoge un enfoque secuencial de ensayo de la fototoxicidad de sustancias químicas.

1.2 DEFINICIONES

Irradiancia: intensidad de radiación ultravioleta (UV) o visible que incide en una superficie, medida en W/m² o mW/cm².

Dosis de luz: cantidad (= intensidad × tiempo) de radiación ultravioleta (UV) o visible que incide en una superficie, expresada en julios (= W × s) por unidad de superficie, p. ej. J/m² o J/cm².

Longitud de onda de la luz UV: UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) y UVC (100-280nm) [designaciones recomendadas por la CIE (Commission Internationale de L'Eclairage)]. También se emplean otras designaciones: la separación entre UVB y UVA suele situarse a 320nm y las radiaciones UVA pueden subdividirse en UV-A1 y UV-A2, con una separación a 340nm aproximadamente.

Viabilidad celular: parámetro que mide la actividad total de una población celular (p. ej. captación del colorante vital rojo neutro por los lisosomas celulares), que, según el efecto que se mida y el tipo de ensayo realizado, corresponde al número total y/o la viabilidad de las células.

Viabilidad celular relativa: viabilidad celular respecto a la de los controles negativos (disolvente) que se toman a lo largo de todo el procedimiento de ensayo (+UV o -UV), pero no se tratan con la sustancia de ensayo.

Modelo de predicción: algoritmo utilizado para transformar los resultados de un ensayo de toxicidad en una predicción de potencial tóxico. En las presentes directrices de ensayo, pueden utilizarse el PIF y el MPE para transformar los resultados del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU en una predicción del potencial fototóxico.

PIF (Photo Irritation Factor - Factor de fotoirritación): factor que se obtiene comparando dos concentraciones citotóxicas igualmente eficaces (EC_{50}) de la sustancia de ensayo en ausencia (-UV) y en presencia (+UV) de una irradiación no citotóxica con UVA/luz visible.

MPE (Mean Photo Effect - Fotoefecto medio): nueva medida derivada de un análisis matemático del trazado completo de dos curvas de concentración-respuesta obtenidas en ausencia (-UV) y en presencia (+UV) de una irradiación no citotóxica con UVA/luz visible.

Fototoxicidad: reacción tóxica aguda que se produce tras la primera exposición de la piel a determinadas sustancias químicas y su posterior exposición a la luz, o por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia química.

Fotoirritación: subcategoría del término "fototoxicidad", empleada para describir únicamente las reacciones fototóxicas que se producen en la piel tras la exposición (aplicación tópica o administración oral) a sustancias químicas. Dichas reacciones fototóxicas provocan siempre daños celulares inespecíficos (del tipo eritema solar).

Fotoalergia: reactividad inmunológica adquirida, que no se produce tras la primera exposición a la sustancia química y a la luz, y que requiere un período de inducción de una o dos semanas antes de que se manifieste la reactividad cutánea.

Fotogenotoxicidad: reacción genotóxica observada para un parámetro genético, que se produce tras la exposición de las células a una dosis no genotóxica de luz UV/visible y a una sustancia química no genotóxica.

Fotocarcinogenicidad: carcinogenicidad inducida por la exposición repetida a la luz y a una sustancia química. Se emplea el término "fotocarcinogénesis" cuando el efecto carcinógeno de las radiaciones UV se ve acrecentado por la exposición a una sustancia química.

1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Además de la *clorpromacina* empleada para el control positivo, que ha de someterse a ensayo en paralelo en cada caso, se recomienda utilizar como sustancias de referencia para el ensayo de fototoxicidad 3T3 NRU un subconjunto de las sustancias químicas empleadas para dicho ensayo en las pruebas interlaboratorios (1)(3)(13).

1.4 CONSIDERACIONES INICIALES

Se ha señalado que numerosos tipos de sustancias químicas producen efectos fototóxicos (5)(6)(7)(8). Su única característica en común es la capacidad de absorber la energía luminosa de la luz solar. Con arreglo a la primera ley de la fotoquímica (ley de Grothaus-Draper), para que se produzca fotorreacción, es necesaria la absorción de una cantidad suficiente de *quanta* de luz. Por tanto, antes de plantearse realizar un ensayo biológico conforme a las presentes directrices, debe determinarse el espectro de absorción de rayos UV/luz visible de la sustancia de ensayo (p. ej. según las directrices de ensayo 101 de la OCDE). Si el coeficiente de extinción/absorción molar es inferior a $10 \text{ litro} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, la sustancia carece de potencial fotorreactivo y no es preciso someterla al ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU ni a ningún otro ensayo biológico de efectos fotoquímicos adversos (Anexo I).

1.5 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se han descrito cuatro mecanismos mediante los cuales la absorción de luz por un cromóforo (químico) puede dar lugar a una reacción fototóxica (7) y todos ellos provocan daños celulares. Así pues, el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU se basa en la comparación de la citotoxicidad de una sustancia cuando se somete a ensayo exponiéndola a una dosis no citotóxica de radiación UVA/luz visible y sin exponerla. La citotoxicidad en este ensayo se expresa como la disminución, ligada a la concentración, de la captación del colorante vital rojo neutro (Neutral Red - NR (9)) 24 horas después de la administración de la sustancia de ensayo y la irradiación.

Se mantienen en cultivo células Balb/c 3T3 durante 24 h hasta que se formen monocapas. Por cada sustancia de ensayo se preincuban durante 1 h dos placas de 96 pocillos con ocho concentraciones distintas de la sustancia de ensayo. A continuación, una de las placas se expone a una dosis no citotóxica de radiación UVA/luz visible de 5 J/cm² UVA (experimento +UV) y la otra se mantiene en la oscuridad (experimento -UV). El medio de tratamiento se sustituye después por un medio de cultivo en las dos placas y, tras otras 24 h de incubación, se determina la viabilidad celular mediante el análisis de captación del rojo neutro (Neutral Red Uptake - NRU) durante 3 h. Se calcula, para cada una de las ocho concentraciones de ensayo, la viabilidad celular relativa, expresada en porcentaje de los controles negativos no tratados. Para predecir el potencial fototóxico, se comparan las reacciones a las distintas concentraciones obtenidas en presencia (+UV) y en ausencia (-UV) de irradiación, por lo general al nivel EC₅₀, es decir, la concentración que inhibe la viabilidad celular en un 50 % respecto a los controles sin tratar.

1.6 CRITERIOS DE CALIDAD

Sensibilidad de las células a las radiaciones UVA - datos de referencia: debe comprobarse periódicamente la sensibilidad de las células a las radiaciones UVA. Se siembran las células a la densidad empleada en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU y al día siguiente se irradian con dosis de 1 a 9 J/cm² de radiación UVA. Un día después, se determina la viabilidad celular mediante el ensayo NRU. Las células cumplen los criterios de calidad si, tras la irradiación con 5 J/cm² UVA, su viabilidad es superior o igual al 80% de la viabilidad de los controles mantenidos en la oscuridad. Con la dosis superior de radiación UVA (9 J/cm²), la viabilidad debe ser, al menos, igual al 50% de la de los controles mantenidos en la oscuridad. Esta comprobación debe repetirse aproximadamente cada 10 pasos celulares.

Sensibilidad de las células de los controles negativos a las radiaciones UVA - ensayo en curso: el ensayo cumple los criterios de calidad si los controles negativos (células en una solución salina equilibrada de Earl (Earl's Balanced Salt Solution - EBSS) con o sin 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) o 1% de etanol (EtOH)) en el experimento +UVA presentan una viabilidad superior o igual al 80% de la de las células no irradiadas en el mismo disolvente del experimento realizado en paralelo en la oscuridad (-UVA).

Viabilidad de los controles negativos: la densidad óptica absoluta (OD_{540 NRU}) medida en el extracto NR de los controles negativos indica si las 1×10⁴ células sembradas por pocillo han crecido en un tiempo de generación normal durante los dos días del ensayo. Éste se ajusta a los criterios de aceptación si la densidad óptica media (OD_{540 NRU}) de los controles no tratados es ≥ 0,2

Control positivo: por cada ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU, debe someterse a ensayo en paralelo una sustancia fototóxica conocida. Se recomienda utilizar la clorpromacina (CPZ) como control positivo, pues es la sustancia que se ha empleado en el estudio de validación EU/COLIPA. Se han definido los criterios de aceptación siguientes para el uso de CPZ conforme al protocolo normalizado en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU: CPZ irradiada (+UVA), EC₅₀= 0,1 a 2,0 µg/ml; CPZ no irradiada (-UVA), EC₅₀ = 7,0 a 90,0 µg/ml. El factor de fotoirritación (PIF), es decir, la variación de la EC₅₀ ha de ser, al menos, de 6.

En lugar de la CPZ, pueden emplearse para los controles positivos en paralelo otras sustancias fototóxicas conocidas adecuadas a la naturaleza química o a las características de solubilidad de la sustancia de ensayo. En ese caso y sobre la base de los datos de referencia, deben definirse debidamente como criterios de aceptación para el ensayo los intervalos de los valores de la EC₅₀ y el PIF o el MPE .

1.7 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.7.1 Preparación

1.7.1.1 Células

Se recomienda el uso de una línea celular permanente de fibroblastos de ratón - Balb/c 3T3, clon 31 - procedente del ATCC o ECACC, pues es la que se ha empleado en el estudio de validación. También pueden obtenerse buenos resultados utilizando otras células o líneas celulares según el mismo protocolo de ensayo, siempre y cuando las condiciones de cultivo estén adaptadas a las necesidades particulares de las células, si bien en tal caso debe demostrarse la equivalencia.

Debe comprobarse periódicamente que las células no están contaminadas por micoplasmas y sólo se utilizarán si los resultados de las comprobaciones son satisfactorios.

Dado que la sensibilidad de las células a las radiaciones UVA puede aumentar con el número de pasos, deben emplearse células Balb/c 3T3 sometidas al menor número posible de pasos, preferiblemente menos de 100. Es importante comprobar periódicamente la sensibilidad de las células Balb/c 3T3 a las radiaciones UVA conforme al procedimiento de control de calidad descrito en las presentes directrices.

1.7.1.2 *Medios y condiciones de cultivo*

Deben emplearse medios de cultivo y condiciones de incubación apropiados para los pasos celulares sistemáticos y durante el procedimiento de ensayo. En el caso de las células Balb/c 3T3, el medio de cultivo es DMEM enriquecido con un 10% de suero de ternera recién nacida, 4 mM de glutamina, penicilina y estreptomycin, y han de incubarse en atmósfera humidificada, a 37°C / 7,5% CO₂. Es particularmente importante que las condiciones de cultivo celular permitan mantener la duración del ciclo celular dentro de los límites normales de la línea celular o las células utilizadas.

1.7.1.3 *Preparación de los cultivos*

Se siembran células procedentes de cultivos stock congelados en un medio de cultivo a una densidad apropiada y se subcultivan al menos una vez antes de utilizarlas en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU.

Para el ensayo de fototoxicidad, las células se siembran en el medio a una densidad que impida que los cultivos confluyan antes de que finalice el ensayo, es decir, cuando se determine la viabilidad celular 48h después de la siembra celular. Para las células Balb/c 3T3 cultivadas en placas de 96 pocillos, se recomienda una densidad de 1×10^4 células por pocillo.

Para cada sustancia de ensayo se siembran las células de igual modo en dos placas distintas de 96 pocillos, que se mantendrán en condiciones de cultivo idénticas a lo largo de todo el procedimiento de ensayo, excepto durante el tiempo en que una de ellas se irradia (+UVA/luz visible) y la otra se mantiene en la oscuridad (-UVA/luz visible).

1.7.1.4 *Activación metabólica*

Si bien es necesario utilizar sistemas de activación metabólica para todos los ensayos *in vitro* de predicción del potencial genotóxico o carcinogénico, en el caso de la fototoxicología no se conoce hasta la fecha ninguna sustancia química que requiera una transformación metabólica para actuar como fototoxina *in vivo* o *in vitro*. Por consiguiente, no resulta necesario ni está fundado científicamente realizar el presente ensayo con un sistema de activación metabólica.

1.7.1.5 *Sustancia de ensayo - Preparación*

Las sustancias de ensayo deben prepararse justo antes de emplearlas, salvo que los datos de estabilidad demuestren que pueden conservarse. Puede ser necesario prepararlas bajo luz roja si es probable que se produzca una fotodegradación rápida.

Las sustancias de ensayo se disuelven en soluciones tampón salinas, como la solución salina equilibrada de Earl (EBSS) o la solución tampón fosfato (Phosphate Buffered Saline - PBS), que no deben contener componentes proteicos ni colorantes indicadores de pH que absorban la luz, con el fin de evitar interferencias durante la irradiación.

Las sustancias de ensayo poco solubles en agua han de disolverse en disolventes apropiados a 100 veces la concentración final deseada y a continuación diluirse a 1:100 con la solución tampón salina. Si se emplea un disolvente, debe hacerse a un volumen constante del 1% (v/v) y en todos los cultivos, es decir, en los controles negativos y en todas las concentraciones de la sustancia de ensayo.

Se recomienda el uso de los disolventes dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol (EtOH). Pueden emplearse otros disolventes de baja citotoxicidad (p. ej. acetona), pero deben evaluarse detenidamente sus propiedades particulares (capacidad de reaccionar con la sustancia de ensayo, de atenuar el efecto fototóxico, de captar radicales).

Si es preciso, puede emplearse un agitador mecánico, la sonicación o el calentamiento a 37°C para facilitar la disolución.

1.7.1.6 Irradiación UV - Preparación

Fuente de luz: la elección de una fuente de luz y un filtrado apropiados es el factor determinante de los ensayos de fototoxicidad. Las porciones de radiación UVA y de luz visible suelen asociarse a la fotosensibilización (7)(10), mientras que las de UVB revisten menor importancia, son directamente muy citotóxicas y su citotoxicidad se multiplica por 1000 entre 313 y 280 nm (11). Uno de los principales criterios para elegir una fuente de luz adecuada es que ésta emita longitudes de onda absorbidas por la sustancia de ensayo y que la dosis de luz (que pueda obtenerse en un tiempo razonable) sea suficiente para detectar los fotosensibilizadores conocidos. Además de ello, las longitudes de onda y las dosis empleadas no han de ser innecesariamente nocivas para el sistema de ensayo, teniendo en cuenta la emisión de calor (porción de infrarrojos).

La mejor fuente de luz es la de los simuladores de radiación solar, en los que se emplean tanto arcos de xenón como arcos de mercurio (dopado) con haluro de metal. Estos últimos presentan la ventaja de emitir menos calor y de ser más económicos, pero no reproducen exactamente la luz solar. Dado que todos los simuladores de radiación solar emiten cantidades importantes de rayos UVB, deben emplearse los filtros adecuados para atenuar sus longitudes de onda altamente citotóxicas.

Para el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU debe usarse un espectro de irradiancia prácticamente exento de UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Se ha publicado un ejemplo de la distribución de la irradiancia espectral del simulador de la radiación solar filtrada utilizado en el estudio de validación del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU (3).

Dosimetría: debe comprobarse con regularidad la intensidad de luz (irradiancia) antes de cada ensayo de fototoxicidad con un medidor de UV de banda ancha adecuado y previamente calibrado en función de la fuente de luz. Ha de comprobarse, asimismo, el correcto funcionamiento de dicho aparato, para lo cual se recomienda utilizar otro medidor de UV de referencia del mismo tipo y calibrado de igual manera. Lo ideal sería emplear, a intervalos mayores, un espectrorradiómetro para medir la irradiancia espectral de la fuente de luz filtrada y comprobar el calibrado del medidor de UV de banda ancha, si bien es cierto que para manejar esos instrumentos se precisa personal debidamente cualificado.

En el estudio de validación se determinó que la dosis de 5 J/cm² (UVA) no resulta citotóxica para las células Balb/c 3T3 y que es suficientemente potente para activar incluso las sustancias químicas debilmente fototóxicas. Para obtener 5 J/cm² en un plazo de 50 min, la irradiancia ha de ajustarse a 1,666 mW/cm². Si se emplea otra línea celular u otra fuente de luz, puede ser preciso adaptar ligeramente la dosis de rayos UVA de manera que no dañe las células y sea suficiente para detectar fototoxinas de referencia. La duración de la exposición a la luz se calcula de la siguiente manera:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dosis de irradiación (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiancia (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W seg.})$$

1.7.2 Condiciones de ensayo

La concentración máxima de la sustancia de ensayo no debe superar los 100 µg/ml, pues todas las sustancias fototóxicas han sido detectadas con concentraciones inferiores y, además, con concentraciones superiores aumenta la incidencia de falsos positivos (sobrepredicción) (13). El pH de la concentración más alta de sustancia de ensayo ha de ser satisfactorio (pH entre 6,5 y 7,8).

Los rangos de las concentraciones de la sustancia de ensayo en presencia (+UVA) y en ausencia (-UVA) de luz deben determinarse de forma adecuada mediante experimentos previos (range-finder experiments). El rango y el intervalo de una serie de concentraciones debe ajustarse de manera que las curvas de concentración-respuesta estén suficientemente confirmadas por los datos experimentales. Debe utilizarse una progresión geométrica de concentraciones (con un factor de dilución constante).

1.7.3 **Procedimiento¹**

1.7.3.1 *1^{er} día*

Se prepara una suspensión de 1×10^5 células/ml en el medio de cultivo y se vierten 100 μ L de medio de cultivo sólo en los pocillos periféricos de una microplaca de cultivo tisular de 96 pocillos (= ensayos en blanco). En los demás pocillos se vierten 100 μ L de una suspensión de 1×10^5 células/ml (= 1×10^4 células/pocillo). Se preparan dos placas con cada sustancia de ensayo: una para determinar la citotoxicidad (-UVA) y la otra para determinar la fotocitotoxicidad (+UVA).

Se incuban las células durante 24 h (7,5% CO₂, 37°C) hasta que formen una monocapa semiconfluyente. Este período de incubación permite la recuperación, la adherencia y el crecimiento exponencial de las células.

1.7.3.2 *2^o día*

Tras la incubación, se decanta el medio de cultivo de las células y se efectúan dos lavados con 150 μ L de EBSS/PBS por pocillo. Se añaden 100 μ L de EBSS/PBS que contengan la concentración adecuada de la sustancia de ensayo o sólo disolvente (control negativo). Se añaden 8 concentraciones distintas de la sustancia de ensayo. Se incuban las células con la sustancia de ensayo durante 60 minutos en la oscuridad (7,5% CO₂, 37°C).

Para realizar la parte (+UVA) del ensayo se irradian las células a temperatura ambiente durante 50 minutos a través de la tapa de la placa de 96 pocillos con una dosis de 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Se airea con un ventilador para evitar la condensación de H₂O bajo la tapa. Se mantienen las placas que no se van a irradiar (-UVA) a temperatura ambiente durante 50 min. (= tiempo de exposición a los rayos UVA) en la oscuridad.

Se decanta la solución de ensayo y se lava dos veces con 150 μ L de EBSS/PBS. Se sustituye la EBSS/PBS por el medio de cultivo y se incuba (7,5% CO₂, 37 °C) hasta el día siguiente (18-22 h).

1.7.3.3 *3^{er} día*

Evaluación microscópica

Se examinan las células en un microscopio con dispositivo para contraste de fase. Se registran los cambios morfológicos de las células debidos a los efectos citotóxicos de la sustancia de ensayo. Se recomienda efectuar esta comprobación para excluir los errores experimentales, si bien las observaciones no se emplean para evaluar la citotoxicidad ni la fototoxicidad.

Ensayo de captación del rojo neutro

Se lavan las células con 150 μ L de EBSS/PBS precalentada. Se elimina la solución de lavado con unos golpecitos suaves. Se añaden 100 μ L de medio con NR y se incuba durante 3h a 37 °C, en atmósfera humidificada con 7,5% CO₂.

Tras la incubación, se elimina el medio con NR y se lavan las células con 150 μ L de EBSS/PBS. Se decanta y se absorbe completamente la EBSS/PBS. (*Facultativo*: centrifugado de la placa invertida.)

Se añaden exactamente 150 μ L de solución de desorción del NR (solución de etanol/ácido acético recién preparada).

Se agita rápidamente la placa en un agitador de microplacas durante 10 min., hasta que el NR se extraiga de las células y forme una solución homogénea.

Se mide la densidad óptica del extracto de NR a 540 nm en un espectrofotómetro y se utilizan los ensayos en blanco como referencia. Se guardan los datos en un formato de fichero apropiado (p. ej. ASCII) para su posterior análisis.

¹ La referencia (12) de la bibliografía contiene mayor información.

2 RESULTADOS

2.1 CALIDAD Y CANTIDAD DE LOS RESULTADOS

Los datos deben permitir un análisis significativo de las respuestas obtenidas con cada concentración, en presencia y en ausencia de radiación UVA/luz visible. Si se comprueba que hay fototoxicidad, tanto el rango de concentraciones como el intervalo entre cada concentración deben establecerse de manera que los datos experimentales puedan representarse en una curva. Dado que una sustancia de ensayo puede no producir efectos citotóxicos con la concentración límite definida de 100 µg/ml en el experimento realizado en la oscuridad (-UVA), pero puede resultar muy citotóxica en el experimento irradiado (+UVA), puede ser necesario emplear rangos de concentraciones de órdenes de magnitud distintos en las dos partes del experimento para obtener resultados de calidad adecuada. Si no se comprueba citotoxicidad en ninguna de las dos partes del experimento (-UVA y +UVA), es suficiente realizar el ensayo con concentraciones separadas por un gran intervalo hasta alcanzar la concentración máxima.

No es preciso comprobar un resultado claramente positivo repitiendo el experimento. Los resultados claramente negativos tampoco han de comprobarse, siempre y cuando la sustancia se haya sometido a ensayo a concentraciones suficientemente altas. En esos casos, basta realizar un experimento principal y uno o varios experimentos previos para determinar los rangos de concentraciones.

Los ensayos que den resultados límite, próximos a la línea de corte del modelo de predicción, deben comprobarse repitiendo el experimento.

Si se considera necesario repetir el ensayo, puede ser importante modificar las condiciones experimentales para obtener un resultado inequívoco. En este ensayo, la preparación de las soluciones de la sustancia problema constituye una variable fundamental. Por consiguiente, al repetir el ensayo puede ser esencial modificar dichas condiciones (codisolvente, trituración, sonicación, etc.). También puede plantearse modificar la duración de la incubación previa a la irradiación. En el caso de las sustancias inestables en el agua puede ser conveniente reducir dicha duración.

2.2 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Si es posible, conviene determinar la concentración de sustancia de ensayo que da lugar a una inhibición del 50% de la captación celular de rojo neutro (EC₅₀). Puede hacerse aplicando cualquier método de regresión no lineal adecuado (preferiblemente una función de Hill o una regresión logística) a los resultados de respuesta a las concentraciones o mediante otros métodos de ajuste (14). Antes de emplear una EC₅₀ para los cálculos posteriores, ha de comprobarse debidamente la calidad del ajuste. También pueden utilizarse métodos de ajuste gráfico para calcular la EC₅₀. En tal caso, se recomienda usar papel probabilístico (eje x: log, eje y: probit), pues en numerosas ocasiones la función concentración-respuesta pasa a ser prácticamente lineal después de esa transformación.

2.3 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS (MODELOS DE PREDICCIÓN)

2.3.1 *Modelo de predicción - versión 1: factor de fotoirritación (PIF)*

Si, tanto en presencia (+UVA) como en ausencia (-UVA) de luz, se obtienen curvas completas de concentración-respuesta, se calcula el factor de fotoirritación (PIF) mediante la fórmula siguiente:

$$a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Un PIF < 5 predice la ausencia de potencial fototóxico, mientras que un PIF ≥ 5 predice la existencia de potencial fototóxico.

Si una sustancia es citotóxica en presencia de luz (+UVA) y no lo es en ausencia de luz (-UVA), no puede calcularse el PIF, si bien ese resultado indica la existencia de potencial fototóxico. En tales casos, puede calcularse un "> PIF" si el ensayo de citotoxicidad (-UV) se ha realizado hasta la concentración de ensayo máxima (C_{máx}), pues éste es el valor que se emplea para el cálculo del "> PIF":

$$b) \quad > PIF = \frac{C_{máx}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Si únicamente puede obtenerse un "> PIF", todo valor >1 predice un potencial fototóxico.

Si no puede calcularse ni la EC₅₀ (-UV) ni la EC₅₀ (+UV) porque la sustancia no produce efectos citotóxicos ni a la concentración de ensayo máxima, significa que ésta carece de potencial fototóxico. En tal caso, se utiliza un "PIF = *1" teórico para caracterizar el resultado.

$$c) \quad \text{PIF} = *1 = \frac{C_{\text{máx}}(-\text{UV})}{C_{\text{máx}}(+\text{UV})}$$

Si únicamente puede obtenerse un "PIF = *1", el ensayo predice la ausencia de potencial fototóxico.

En los casos b) y c), a la hora de predecir el potencial fototóxico deben tomarse detenidamente en consideración las concentraciones alcanzadas en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU.

2.3.2 Modelo de predicción - versión 2: fotoefecto medio (MPE)

Puede aplicarse como variante una nueva versión del modelo de predicción del potencial fototóxico, que se ha elaborado sobre la base de los datos del estudio de validación EU/COLIPA (15) y se ha probado en ciego en un estudio posterior relativo a la fototoxicidad *in vitro* de sustancias empleadas como filtros de UV (13). Este modelo permite superar la limitación del modelo basado en el PIF en los casos en que no puede obtenerse una EC₅₀. El modelo utiliza el fotoefecto medio (MPE), que es una medida basada en la comparación de las curvas completas de concentración-respuesta. Para aplicar el modelo MPE, la Universidad Humboldt (Berlín, Alemania) ha elaborado un programa informático especial, que puede obtenerse de forma gratuita.

2.4 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Un resultado positivo en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU (PIF ≥ 5 o MPE ≥ 0,1) indica que la sustancia de ensayo presenta un potencial fototóxico. Si dicho resultado se ha producido con concentraciones inferiores a 10 µg/ml, es probable que la sustancia de ensayo también tenga efectos fototóxicos en diversas condiciones de exposición *in vivo*. Si el resultado es positivo únicamente con la concentración de ensayo máxima de 100 µg/mL, para evaluar el peligro o el poder fototóxico puede ser necesario tomar en consideración otros aspectos como la penetración y la absorción cutáneas y la posible acumulación de la sustancia en la piel, o someter la sustancia a otro tipo de ensayo para confirmar los resultados empleando, por ejemplo, un modelo de piel humana *in vitro*.

Un resultado negativo en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU (PIF < 5 o MPE < 0,1) indica que la sustancia de ensayo no tiene efectos fototóxicos en las células cultivadas de mamífero en las condiciones aplicadas. Si la sustancia se ha podido someter a ensayo hasta la concentración máxima de 100 µg/ml, un resultado negativo indica que la sustancia carece de potencial fototóxico y es improbable que produzca efectos fototóxicos *in vivo*. Si se obtienen reacciones tóxicas idénticas (EC₅₀+UV y EC₅₀-UV) con concentraciones inferiores, los datos han de interpretarse del mismo modo. Sin embargo, si no se ha producido toxicidad (+UV y -UV) y la solubilidad de la sustancia de ensayo en el agua ha limitado las concentraciones a menos de 100 µg/ml, cabe dudar de la compatibilidad de la sustancia con el método de ensayo y debe plantearse la realización de un ensayo de confirmación (por ejemplo, con un modelo de piel *in vitro* o *ex vivo*, o bien un ensayo *in vivo*).

3 INFORME INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

- datos de identificación y nº CAS, si se conoce
- naturaleza física y pureza
- propiedades fisicoquímicas importantes para la realización del estudio
- estabilidad y fotoestabilidad, si se conocen

Disolvente:

- justificación de la elección del disolvente
- solubilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente
- porcentaje de disolvente presente en el medio de tratamiento (EBSS o PBS)

Células:

- tipo y procedencia de las células
- ausencia de micoplasma
- número de pasos celulares, si se conoce
- sensibilidad de las células a la radiación UVA, determinada con el equipo de irradiación utilizado en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU

Condiciones de ensayo (a) - *incubación antes y después del tratamiento*:

- tipo y composición del medio de cultivo
- condiciones de incubación (concentración de CO₂, temperatura y humedad)
- duración de la incubación (tratamiento previo y posterior)

Condiciones de ensayo (b) - *tratamiento con la sustancia*:

- fundamento de la elección de concentraciones de la sustancia de ensayo empleadas en presencia y en ausencia de radiación UV/luz visible
- en caso de que la sustancia de ensayo sea escasamente soluble y no sea citotóxica, fundamento de la elección de la mayor concentración empleada
- tipo y composición del medio de tratamiento (solución salina tampón)
- duración del tratamiento químico

Condiciones de ensayo (c) - *irradiación*:

- fundamento de la elección de la fuente de luz empleada
- características de la irradiancia espectral de la fuente de luz
- características de transmisión/absorción del filtro o filtros utilizados
- características del radiómetro y condiciones de calibrado
- distancia entre la fuente de luz y el sistema de ensayo
- irradiancia UVA a esa distancia, expresada en mW/cm²
- duración de la exposición a la radiación UV/luz visible
- dosis de radiación UVA (irradiancia × tiempo), expresada en J/cm²
- temperatura aplicada a los cultivos celulares durante la irradiación y a los mantenidos en la oscuridad en paralelo

Condiciones de ensayo (d) - *ensayo NRU*

- composición del medio NR
- duración de la incubación en NR
- condiciones de incubación (concentración de CO₂, temperatura y humedad)
- condiciones de extracción del NR (agente de extracción, duración)
- longitud de onda empleada para la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica del NR
- segunda longitud de onda (referencia), si procede
- contenido del ensayo en blanco del espectrofotómetro, si procede

Resultados

- viabilidad celular obtenida con cada concentración de la sustancia de ensayo, expresada en % de la viabilidad media de los controles
- curvas de concentración-respuesta (concentración de la sustancia de ensayo - viabilidad celular relativa), obtenidas en los experimentos +UVA y -UVA realizados en paralelo
- análisis de los datos derivados de las curvas de concentración-respuesta: si es posible, computación/cálculo de la EC₅₀ (+UVA) y EC₅₀ (-UVA)
- comparación de las dos curvas de concentración-respuesta obtenidas en presencia y en ausencia de irradiación UVA/luz visible, calculando el factor de fotoirritación (PIF) o el fotoefecto medio (MPE)
- clasificación del potencial fototóxico
- criterios de aceptación del ensayo (a) - *control negativo en paralelo*:
 - viabilidad absoluta (densidad óptica del extracto de NR) de las células irradiadas y las no irradiadas
 - datos de referencia del control negativo, media y desviación estándar
- criterios de aceptación del ensayo (b) - *control positivo en paralelo*:
 - EC₅₀ (+UVA), EC₅₀ (-UVA) y PIF de la sustancia del control positivo
 - datos de referencia de la sustancia del control positivo: EC₅₀ (+UVA), EC₅₀ (-UVA) y PIF, media y desviación estándar

Discusión de los resultados

Conclusiones

1. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro* **8**, 793-796.
2. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA **26**, 7-8.
3. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W and Brantom, P. (1998) EU/COLIPA "*In vitro* phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in Vitro* **12**, 305-327.
4. OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods - *OECD Publications Office*, Paris, 1996.
5. Lovell W. W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxicology in Vitro* **7**, 95-102.
6. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research progress in organic, biological and medicinal chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
7. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA **22**, 314-348.
8. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of photobiology"; edited by KC Smith. Plenum Press, New York; 2nd edition, pp. 79-110.
9. Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **24**, 119-124.
10. Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996). Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology"; edited by FN Marzulli and HI Maibach. Published by Taylor & Francis, Washington DC; 5th Edition, pp. 515-530.
11. Tyrrell R. M. and Pidoux M (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Research* **47**, 1825-1829.
12. ZEBET / ECVAM / COLIPA - Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test. Drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
13. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998). A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test. ATLA **26**, 679-708.
14. Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995) Mathematical modelling of cellular responses to external signals. *Journal of Biological Systems* **3**, 127-138.
15. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA **25**, 445-462.

ANEXO 1

Función del ensayo de fototoxicidad 3T3 NRU en un enfoque secuencial de los ensayos de fototoxicidad de sustancias químicas

